

**PHOTOREVERSIBLE FLUOROPHORSYSTEME IN INSEKTENAUGEN**  
**– EINE MIKROSPEKTROFLUOROMETRISCHE STUDIE –**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Abteilung für Biologie  
an der Ruhr-Universität Bochum

von

**ACHIM JUSE**  
aus Langenberg

Eingereicht im Juni 1987







**PHOTOREVERSIBLE FLUOROPHORSYSTEME IN INSEKTENAUGEN**  
**- EINE MIKROSPEKTROFLUOROMETRISCHE STUDIE -**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Abteilung für Biologie  
an der Ruhr-Universität Bochum

von

**ACHIM JUSE**  
aus Langenberg

Eingereicht im Juni 1987



|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung                                                                                    | 1  |
| 2. Material und Methoden                                                                         | 4  |
| 2. 1. Tiermaterial                                                                               | 4  |
| 2. 2. Meßapparatur                                                                               | 5  |
| 2. 3. Messungen am Ganztier                                                                      | 12 |
| 2. 4. Präparationen                                                                              | 14 |
| 2. 5. Injektion von Ubichinon in Augen von Cal-<br>liphora                                       | 14 |
| 2. 6. Lösungen                                                                                   | 14 |
| 2. 7. Herstellung von Vesikeln                                                                   | 15 |
| 2. 8. Aufnahme von Fluoreszenzspektren - Theorie                                                 | 16 |
| 2. 8.1. Anregungsdifferenzspektrum $\Delta F_s(\lambda_s)$                                       | 19 |
| 2. 8.2. Emissionsdifferenzspektrum $\Delta F_e(\lambda_m)$                                       | 20 |
| 2. 9. Korrektur der gemessenen Fluoreszenzspek-<br>tren                                          | 21 |
| 2.10. Berechnung der absoluten von den Fluoro-<br>phoren emittierten Photonenanzahlen            | 22 |
| 2.11. Kinetik der photochemischen Umwandlung ei-<br>nes Fluorophors A in einen Fluorophor B      | 25 |
| 3. Ergebnisse                                                                                    | 32 |
| 3. 1. Qualitative Beobachtungen                                                                  | 32 |
| 3. 2. Das Fluorophorsystem der Rhabdomere der<br>Fliege                                          | 35 |
| 3. 2.1. Photokinetik der Fluorophore                                                             | 35 |
| 3. 2.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 37 |
| 3. 2.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 40 |
| 3. 2.4. Analyse der photochemischen Umwandlungs-<br>reaktionen $A_R$ in $B_R$ und $B_R$ in $A_R$ | 45 |
| 3. 2.5. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Rhod-<br>opsin Gehalt                                   | 53 |
| 3. 2.6. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom extazel-<br>lulären pH-Wert                             | 54 |
| 3. 3. Das Fluorophorsystem in den Semperzellen<br>der Fliege                                     | 56 |
| 3. 3.1. Photokinetik der Fluorophore                                                             | 56 |
| 3. 3.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 61 |
| 3. 3.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 62 |
| 3. 4. Das Fluorophorsystem in der Cornea der<br>Fliege                                           | 66 |
| 3. 4.1. Photokinetik der Fluorophore                                                             | 66 |
| 3. 4.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 67 |
| 3. 4.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 67 |
| 3. 5. Das Fluorophorsystem in den Rhabdomeren<br>von Deilephila                                  | 71 |
| 3. 5.1. Photokinetik der Fluorophore                                                             | 71 |
| 3. 5.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 72 |
| 3. 5.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 75 |
| 3. 6. Das Fluorophorsystem in den Semperzellen<br>von Deilephila                                 | 78 |
| 3. 6.1. Photokinetik der Fluorophore                                                             | 78 |
| 3. 6.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 80 |
| 3. 6.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                                  | 82 |

|                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. 6.4. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom extrazellulären pH-Wert                            | 85  |
| 3. 7. Das Fluorophorsystem in der Cornea von Deilephila                                     | 87  |
| 3. 7.1. Photokinetik der Fluorophore                                                        | 87  |
| 3. 7.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                             | 89  |
| 3. 7.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                             | 89  |
| 3. 8. Das Fluorophorsystem in den Semperzellen von Ascalaphus                               | 92  |
| 3. 8.1. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                             | 92  |
| 3. 8.2. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                             | 92  |
| 3. 9. Fluoreszenzmessungen an Fliegenaugen in vivo                                          | 97  |
| 3.10. Die Fluoreszenz von Ubichinon in Phospholipidvesikeln                                 | 99  |
| 3.10.1. Photokinetik der Fluorophore                                                        | 99  |
| 3.10.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems                                             | 100 |
| 3.10.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems                                             | 102 |
| 3.10.4. Der Einfluß von pH-Gradienten auf die Fluoreszenz von Vesikeln                      | 105 |
| 3.10.5. Injektion von Ubichinon in Fliegenaugen                                             | 109 |
| 3.11. Zusammenfassung der Anregungs- und Emissionsmaxima der untersuchten Fluorophorsysteme | 110 |
| 4. Diskussion                                                                               | 112 |
| 4. 1. Vorkommen der untersuchten Fluorophorsysteme                                          | 112 |
| 4. 2. Reaktionsschemata der photoreversiblen Fluorophorsysteme                              | 113 |
| 4. 3. Mögliche chemische Natur der Fluorophore                                              | 119 |
| 4. 4. Abschätzung der molekularen Dichte der Fluorophore                                    | 130 |
| 4. 5. Mögliche physiologische Bedeutung der Fluorophorsysteme                               | 131 |
| 5. Zusammenfassung                                                                          | 134 |
| 6. Literatur                                                                                | 137 |

## 1. Einleitung

Schon bereits Helmholtz (1879) beobachtete Autofluoreszenz in der Vertebratenretina. Nach Aufklärung der photochemischen Reaktionskaskade des Sehfärbstoffs konnten Guzzo und Pool (1969) und Liebman und Leigh (1969) nachweisen, daß diese mit den Intermediärfärbstoffen korreliert ist.

Sehr auffällige Autofluoreszenz zeigen auch die Komplexaugen der Insekten bei Anregung mit UV und blauem Licht. Von welchen Strukturen des dioptrischen Apparats, der Photorezeptoren und der Pigmentzellen diese Autofluoreszenz ausgeht, ist nur lückenhaft bekannt. Bisher am besten untersucht sind die Modulationen der Fluoreszenz der Photorezeptoren der Fliege. Mit der von Franceschini (1977) und Stark et al. (1977) entwickelten Meßtechnik gelang es anhand der Eigenschaften der "tiefen Pseudopupille" Fluoreszenzmodulationen mit der Photorezeptoraktivität intakter Tiere zu korrelieren. Im Vordergrund des Interesses stand hierbei zunächst die Autofluoreszenz des photoreversiblen Rhodopsin (R) - Metarhodopsin (M) - Systems in den Rezeptoren R1 bis R6 des Fliegenauges (Musca: R 490, M 570; Minke und Kirschfeld, 1979 und Calliphora: R 495, M 580; Hamdorf et al., 1973; Hamdorf, 1979; Schwemer, 1979, 1986). Es wurde gezeigt, daß durch intensive Bestrahlung des Metarhodopsins ein Photoprodukt (M') hoher Autofluoreszenz entsteht, mit einem Emissionsmaximum bei 650nm. Auch M' läßt sich wie M durch Bestrahlung oberhalb 600nm zum Rhodopsin regenerieren. Dabei erlischt die Autofluoreszenz (Musca: Franceschini et al., 1981; Franceschini und Stavenga, 1981; Stavenga et al., 1984). Die Bildung fluoreszierender Intermediärfärbstoffe wird besonders durch UV-Strahlung for-

ciert (*Drosophila*: Stark et al., 1979; Miller et al., 1984).  
-----  
Es wird vermutet, daß die besonders starke Wirkung der UV-Strahlung durch das "sensitizing pigment" (Kirschfeld, 1986) hervorgerufen wird, welches absorbierte Energie auf den Chromophor des Sehfarbstoffs überträgt (Miller et al., 1984).

Bestimmte Modulationen der in vivo beobachteten Fluoreszenz stehen in engem Zusammenhang mit der lichtinduzierten Stoffwechselaktivität des Facettenauges. So steigt der Sauerstoffverbrauch des Fliegenauges unmittelbar nach der Rezeptorerregung bis auf das Zwanzigfache an. Die Höhe dieser etwa 20 Sekunden dauernden Stoffwechselsteigerung ist streng mit der Amplitude der elektrischen Antwort der Rezeptoren korreliert (Autrum und Tscharrntke, 1962; Hamdorf und Kaschef, 1964; Hamdorf und Schwemer, 1974; Tsacopoulos und Poitry, 1982; Hamdorf et al., 1987). Diese Änderungen des Sauerstoffverbrauchs lassen vermuten, daß mit der Rezeptorerregung Änderungen im Redoxsystem der Mitochondrien einhergehen. An lebenden *Calliphorae* fanden Stavenga und Tinbergen (1983), daß der Zeitverlauf der im Bereich von 510 bis 600nm gemessenen Autofluoreszenz bei Blauanregung mit der Dauer der vorangegangenen Dunkeladaptation variiert. Diese Fluoreszenzänderungen sind eng mit Änderungen der Redoxzustände von Farbstoffen der Atmungskette verknüpft (Tinbergen und Stavenga, 1986 und 1987).

Sowohl bei orthodromer als auch bei antidromer Fluoreszenzanregung in intakten Komplexaugen werden stets alle von verschiedenen Strukturen oder Organellen herrührenden Fluoreszenzen simultan erfaßt. Mit Hilfe dieser Meßtechnik ist es daher sehr schwierig die Herkunft und die Eigenschaften der

verschiedenen Fluorophore genauer zu analysieren. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Bauelemente des Komplexauges wie die der Rhabdomere, der Semperzellen und der Corneae isoliert untersucht. Als Versuchsmaterial wurden die neuralen Superpositionsäugen der Schmeißfliege (*Calliphora erythrocephala*, Meig.), das Superpositionsauge des dämmerungsaktiven mittleren Weinschwärmers (*Deilephila elpenor*) sowie die UV-sensitiven Superpositionsäugen des tagaktiven Netzflüglers *Ascalaphus macaronius*, Skop. untersucht.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1. Tiermaterial

---

Für die Untersuchungen wurden Augen der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera, Calliphoridae), vom mittleren Weinschwärmer *Deilephila elpenor* L. (Lepidoptera, Sphingidae) und vom Netzflügler *Ascalaphus macaronius* Skop. (Neuroptera, Ascalaphidae) verwendet. Während die Augen von *Calliphora* zum Bautyp der Appositionsaugen gehören, in denen sich die Rhabdomere der Sehzellen von der Basalmembran bis hin zum Kristallkegel erstrecken, gehören die Augen von *Deilephila* und *Ascalaphus* zum Superpositionstyp, bei dem eine beträchtliche Distanz zwischen den Kristallkegeln und den Rhabdomen besteht.

Von *Calliphora* wurden hauptsächlich die weißäugige Mutante "Chalky", aber auch vergleichend die Wildform und die Mutanten "White Apricot" und "Lemon" untersucht. Für die Experimente an der Mutante "Chalky" wurden verschiedene Tierzuchten verwendet, die als Maden entweder auf Rinderleber, auf Rinderherz oder auf der Mangeldiät II nach Zinkler (1982) aufgezogen wurden. Leber ist eine Vitamin-A-reiche Diät, die in den Photorezeptoren der Imagines einen maximalen Rhodopsingehalt bedingt, wohingegen die Photorezeptoren der Tiere, die auf der Vitamin-A-armen Herzdiät aufgezogen werden, einen geringeren Rhodopsingehalt von etwa einem Siebtel aufweisen (Hamdorf 1979). Fliegen, die auf der extrem Vitamin-A-armen Mangeldiät II angezogen wurden, haben einen noch geringeren Rhodopsingehalt von nur 1/200 (Zinkler 1982). Die Fliegen des Wildtyps und die Mutanten "White Apricot" und "Lemon" wurden ausschließlich auf Rinderherz angezogen. Alle Experimente wurden an drei bis zehn Tage alten Männchen durchgeführt.

Die Puppen des Schwärmers *Deilephila elpenor* wurden von World-wide Butterfly Ltd. in Sherwood, England bezogen und bei 4°C in Torf gelagert. Die Imagines schlüpften nach ca. 14 Tagen bei Haltung der Puppen zwischen 23°C und 28°C und einer relativen Luftfeuchte von 80%. Die Schmetterlinge wurden in einem zwölfstündigen Helldunkelzyklus gehalten und mit einer Lösung aus einem Teil Glucose, einem Teil Honig und einem Teil Wasser gefüttert. Die Experimente wurden an zwei bis sechs Tage alten Imagines durchgeführt. Vor der Präparation wurden die Tiere für mindestens zwei Stunden dunkeladaptiert.

Die Netzflügler *Ascalaphus macaronius* stammten aus Slowenien (Jugoslawien), wo sie jeweils im Juni in küstennahen Karstwiesen gefangen wurden. Die Tiere wurden bei 4°C nach Bochum transportiert und dort wieder bei Raumtemperatur in Insektenkästen gehalten. Die Tiere wurden mit Fliegen bzw. mit Rinderleber gefüttert und überlebten unter diesen Bedingungen bis zu drei Wochen.



## 2.2. Meßapparatur

Die Meßapparatur (Abb.1) wurde auf der Basis eines kommerziellen Fluoreszenzmikroskops (Leitz Orthoplan) entwickelt. Als Anregungslicht der Fluoreszenz wurde entweder die Strahlung einer 1600 Watt Xenonbogenlampe (XBO 1600 W, Osram) oder einer Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 200 W, Osram) verwendet. Das Licht der Xenonbogenlampe wurde nach Passage einer wassergekühlten Wärmeschutzküvette (2 KG 1, Schott und aqua bidest), eines rechnergesteuerten Gittermonochromators (GM; B&M Spektrotronik BM 25; Bandbreite 12 nm) und einer variablen Irisblende mittels eines halbdurchlässigen Spiegels in das Mikroskopob-

Schematische Darstellung des mikrospektalfuorometrischen Versuchsaufbaus. Lichtquellen : HBO Quecksilberhochdrucklampe (200W, 100Hz) für Kinetikmessungen und Adaptation; XBO = Xenonbogenlampe (1600W) zur Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren; 6V 60W = regelbare Niedervoltlampe zur Einstellung des Präparats. Optische Elemente : CF = Verlaufsfilter zur spektralen Analyse des Emissionslichtes; Co = Kondensor; DI = Lochlinse; DIV = variable Irislinse; EF = Kantenfilter; FC = Farbfilter; GM = Gittermonochromator zur spektralen Zerlegung des Anregungslichtes; MA = Klappspiegel für den Adaptationsstrahlengang; MO = einschleppbares Prisma zur visuellen Beobachtung; MQ = halbdurchlässiger Spiegel; Ob = Objektiv; Oc = Okular; SH = Verschluss. Registrierereinrichtungen : ADS = Verstärker-Diskriminatoreinheit zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren; PDP 11 = Rechner zur Aufnahme von Fluoreszenz- und Fluoreszenzendifferenzspektren (wie in der Abbildung gezeigt); PMT = Photomultipliereinheiten (a) Photonen-zählrohr zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren b) analoger Photomultiplier zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken; SO = Speicheroszilloskop zur Registrierung von Fluoreszenzkinetiken. SP = Präparat. Der Einschub zeigt die Transmissionskurven der Farbfilter FC, die zur Adaptation der Präparate verwendet wurden.

ektiv (Ob; Leitz 10x, n.A.= 0.25, Leitz 40x, n.A.= 0.65 oder Zeiss Plan-Neofluar 40x, n.A.= 0.9) eingespiegelt. Der dichromatische Strahlenteiler, mit dem das Fluoreszenzmikroskop serienmäßig ausgerüstet ist, wurde nur bei Aufnahme der ersten Fluoreszenzspektren sowie bei den Messungen der Kinetik der Fluorophorumwandlungen verwendet. Für die meisten Messungen wurde der dichromatische Strahlenteiler durch ein  $45^{\circ}$  zum Strahlengang geneigtes Quarzdeckglas (MQ) ersetzt. Hierdurch wurde einerseits der spektrale Meßbereich zum langwelligen UV hin erweitert und andererseits störende Autofluoreszenz, die an Kittschichten in Strahlenteilern anfällt, ausgeschaltet. Die variable Irisblende (DIV) befand sich in der Bildebene des Objektivs (Ob) und konnte somit in die Präparatebene verkleinert projiziert und hierdurch die beleuchtete Fläche in der Präparatebene aufgrund ihres Abbilds variieren. Der Durchmesser dieser beleuchteten Fläche variierte beim Objektiv 10x zwischen 133 und 200  $\mu\text{m}$ , beim Objektiv Leitz 40x zwischen 38 und 50  $\mu\text{m}$  und beim Objektiv Zeiss 40x zwischen 33 und 50  $\mu\text{m}$ . Die von der Quecksilberhöchstdrucklampe emittierte Strahlung (Lichtpulse von 100 Hz) wurde über einen Klappspiegel (MA) in den Strahlengang gelenkt. Dieses Licht wurde zur spektralen Adaptation der Präparate und zur Messung der Kinetik von Fluoreszenzänderungen verwendet. Durch Einsetzen verschiedener Filter (FC) und Filterkombinationen (Schott) wurden gewünschte Spektralbereiche herausgefiltert. UV-Strahlung wurde durch ein UG 11 Filter (2mm), violette Strahlung durch ein Filter BG 12 und blaue Strahlung durch die Kombination BG 12 und GG 435 erzielt. Die Transmissionskurven der Filter sind im Einschub von Abb.1 dargestellt.

Zur Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren wurde die vom Gittermonochromator (GM) spektral zerlegte Strahlung der Xenonlampe verwendet.

Die Präparate wurden mit einem Stereookular (Oc) beobachtet, wobei das vom Objekt reflektierte, emittierte oder transmittierte Licht mittels eines Spiegels (MO) in das Okular umgelenkt wurde. Die Justierung der Präparate erfolgte unter Rotlicht (EF; Schott Kantenfilter RG 630) mittels einer regelbaren Niedervoltlampe (maximal 6V, 60W). Die fluoreszierenden Präparatstrukturen wurden vom Objektiv in der Blendenebene (DI) vor dem Verlaufslinienfilter (CF; Schott, 400 bis 700 nm) abgebildet. Der Durchmesser dieser Blende betrug 2mm entsprechend einem Objektfeld von 50  $\mu\text{m}$  (Objektive 40x) bzw. 200  $\mu\text{m}$  (Objektiv 10x) Durchmesser. Das Verlaufslinienfilter (Bandbreite 18 nm; Transmission 0.4) wurde zur Analyse der spektralen Zusammensetzung des Fluoreszenzlichtes von einem computergesteuerten Schrittmotor angetrieben. Gestreutes Anregungslicht wurde mit Hilfe eines zusätzlichen Kantenfilters (EF; normalerweise Leitz K 430 oder K 530; Transmission größerer Wellenlängen etwa 0.85) eliminiert.

Der durch Reflektion und Absorption der Mikroskopoptik zu erwartende Verlust an Emissionslicht wurde mittels zweier Messungen bestimmt. Zunächst wurde die Strahlungsenergie am Ort des Objekts mit Hilfe einer geeichten Thermosäule (Model 2M; Dexter Research Center Inc.) bestimmt. Dann wurde ein Oberflächenspiegel, der nahezu das gesamte Anregungslicht reflektierte, in der Objektebene des Objektivs plaziert und nach Entfernung des Sperrfilters (EF) und des Verlaufslinienfilters (CF) hinter der Blende (DI) die Energie des vom Oberflächen-

spiegel reflektierten Anregungslichts bestimmt. Division der Meßwerte ergibt den Schwächungsfaktor der Energie durch das optische System. Bei der Wellenlänge 400nm wurde eine Schwächung des Lichtflusses auf 0.4 (Objektiv 40x) bzw. 0.16 (Objektiv 10x) gefunden.

Der absolute Quantenfluß in der Präparatebene erwies sich als direkt proportional zur beleuchteten Fläche. Das heißt, daß die Strahlungsdichte des Anregungslichts weitgehend homogen war und es berechtigt ist, die Photonenflußdichte auf kleine Flächen von wenigen  $\mu$ , also auf die Flächen der zu untersuchenden Organellen zu extrapolieren. Die spektrale Energieverteilung der Xenonbogenlampe wurde über den Spektralbereich von 300 bis 520 nm für eine Bandbreite von 18 nm nach zwei Verfahren bestimmt. Bei Verfahren 1 wurde die bei Anregung durch Wellenlängen dieses Bereichs von einer konzentrierten Rhodamin B-Lösung (10 mg/1ml 0.05n Ethylenglycol) bei 590nm emittierte Photonenzahl bestimmt. Da konzentrierte Rhodamin B-Lösung alle Wellenlängen dieses Spektralbereichs vollständig absorbiert, muß die emittierte Photonenzahl als Funktion der Anregungswellenlänge proportional der spektralen Strahlungsdichte des Anregungslichtes sein (White und Argauer 1970). Bei Verfahren 2 wurde die Energie des Anregungslichtes direkt mit der Thermosäule bestimmt. Die beiden gemessenen Spektren sind einander sehr ähnlich (Abb.2). In Tabelle 1 ist die absolute Photonenflußdichte dieses Spektrums, gemessen bei 400nm, im Vergleich zu den absoluten Photonenflußdichten der UV-, Violett und Blau-Adaptionsstrahlung der Quecksilberhöchstdrucklampe zusammengefaßt. Bei diesen Messungen wurde das Quarzdeckglas als Strahlenteiler verwendet. Die Intensi-

| Objektiv | Xenonlampe<br>400 nm | Quecksilberhöchstdrucklampe |                    |                   |
|----------|----------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|
|          |                      | UV                          | Violett            | Blau              |
| 10x      | $4.3 \times 10^6$    | $410 \times 10^6$           | $1100 \times 10^6$ | $245 \times 10^6$ |
| 40x      | $15.0 \times 10^6$   | $1100 \times 10^6$          | $3000 \times 10^6$ | $620 \times 10^6$ |

Tabelle 1

Photonenflußdichten (Quanten  $\times \mu\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ ).

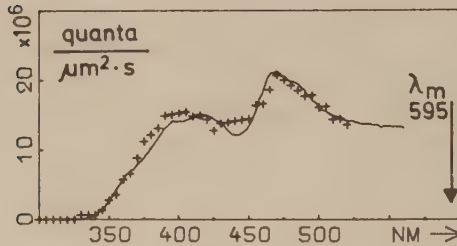


Abb. 2

Spektrale Intensität der Anregungslichtquelle in der Präparatenebene (XBO 1600W in Kombination mit Gittermonochromator), dargestellt als Photonenflußdichte (Quanten  $\times \mu\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ ). Kreuze: Messungen mit der Thermosäule auf Photonenflußdichte umgerechnet. Durchgezogene Linie: Anregungsspektrum einer konzentrierten Rhodamin B-Lösung 10mg/ml Ethylenglykol; Schichtdicke 0.3mm; Meßwellenlänge 595nm). Die Amplitude wurde auf die Amplitude der Messung mit der Thermosäule normiert. Das von Rhodamin B gewonnene Anregungsspektrum wurde zur Korrektur der in den Abbildungen 17, 32, 43, 61 und 69 gezeigten Anregungsspektren verwendet.

täten waren etwa zwölfmal höher bei Verwendung des dichromatischen Strahlenteilers. Diese höheren Intensitäten wurden für die Kinetikmessungen verwendet.

Die Fluoreszenz der Zellstrukturen wurde mit Hilfe zweier verschiedener Verfahren registriert. Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde eine Photonenzähleinrichtung, bestehend aus einem Zählrohr (Thorn EMI; 9863 QB 100) in Verbindung mit einer Verstärker-Diskriminatoreinheit (Products for Research; ADS 120) verwendet. Die vom Photonenzähler diskriminierten Photonen wurden über jeweils 10 ms hin gezählt. Die Aufnahme-frequenz betrug 50 Zählungen pro Sekunde. Zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken wurde dagegen ein analoger Sekundärelektronenvervielfacher (EMI; 6256B mit Kathode S13) eingesetzt. Die Analogsignale wurden in einem Speicheroszilloskop (Tektronix; Model 5103 N) gespeichert und photographisch dokumentiert. Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe eines Rechners (Digital Equipment; PDP 11) aufgenommen, abgespeichert und wieder ausgegeben. Die Ausgabe der Spektren erfolgte entweder direkt auf ein Graphikterminal (Tektronix; 4006-1) oder über einen Zweikanalschreiber (Metrawatt; Servogor XY). Über den Rechner wurden außerdem die Schrittmotore vom Monochromator (GM) und vom Verlaufslinienfilter (CF) angesteuert. Mit dieser Anordnung konnten sowohl Anregungs- als auch Emissionsspektren aufgenommen werden, je nachdem ob der Gittermonochromator oder das Verlaufslinienfilter angesteuert wurde. Die Auflösung betrug einen Datenpunkt pro 2 nm bei einer Meßgeschwindigkeit von 75 nm pro Minute. Bei dieser Geschwindigkeit wurde jeder Datenpunkt durch Mittelung von 80 10 ms-Messungen gewonnen.

Zur photographischen Dokumentation fluoreszierender Zellstrukturen wurde das Verlaufslinienfilter inklusive Photonzählrohr gegen eine vollautomatische Mikroskopkamera (Leitz; Orthomat) ausgetauscht.

### 2.3. Messungen am Ganztier

---

Für Fluoreszenzmessungen an Augen lebender Tiere wurden diese mit zwei Drahtbügeln auf einem Styroporblock befestigt. Die Köpfe von Calliphora und Ascalaphus wurden zusätzlich mittels gekreuzter Insektennadeln fixiert. Bei Deilephila wurde der Kopf durch eine median eingestochene Insektennadel arretiert. Die Augen wurden so orientiert, daß der Zentralbereich eines Auges im Zentrum des Objektivs lag.

### 2.4. Präparationen

---

Zur Untersuchung der cornealen Fluoreszenz wurden die Augen knapp oberhalb des Augenrandes mit einer Rasierklinge abgekappt. Daran anschließend wurden diese Kappräparate mit einer Präpariernadel grob vorgereinigt. Die endgültige Reinigung der Cornea erfolgte durch Ultraschall in einer 150 mM NaCl-Lösung. Hierzu wurde ein Sonifier (Branson; Sonic Power) mit einer eisgekühlten Iridiumspitze verwendet.

Zur Isolierung der Photorezeptoren bzw. der Kristallkegel der Fliege wurden nach Entfernen der Hinterhauptwand die Augen vom Hirn her bis zur Basalmembran freipräpariert, anschließend mit einer Iridektomieschere herausgeschnitten und dann auf einen Objektträger in 150 mM NaCl-Lösung überführt. Die Augen wurden zunächst mit einer Rasierklinge geteilt und dann mit einer Präpariernadel die an der Cornea haftenden Kristallkegel und die damit fester verbundenen Ommatidien über die

Schnittkante der zweigeteilten Cornea abgestreift. Durch anschließende mechanische Zerteilung mittels Pinzette und Präpariernadel konnten sowohl isolierte Rhabdomere und isolierte Kristallkegel als auch Verbände dieser Bauelemente gewonnen werden.

Zur Präparation der Kristallkegel bzw. der Photorezeptoren von *Deilephila* wurden die etwa halbkugelförmigen Augen zu einem Drittel mit einer Rasierklinge abgekappt, so daß die Retina unbeschädigt blieb. Die gewonnenen Augenkappen wurden so lange vorsichtig mit 150mM NaCl-Lösung gespült, bis die Schirmpigmentgranula vollständig ausgewaschen waren. Die Augenkappen wurden in neue Lösung überführt und die anhaftenden Kristallkegel vorsichtig abgestreift. Durch mehrfaches Spülen auf einem Elektronenmikroskopienetz (Maschenweite  $45\mu$ ) ließ sich eine hochgereinigte Fraktion von Kristallkegeln nebst umgebenden Semperzellen gewinnen. Die Retina selbst wurde mit einer gebogenen Pinzette aus dem am Kopf verbliebenen Augen- teil herauspräpariert und in 150 mM NaCl-Lösung auf einen Objektträger überführt. Bei Orientierung der Retina distalseitig zum Auflichtobjektiv konnte die Fluoreszenz der Ommatidien insgesamt erfaßt werden. Zur genaueren Analyse der vom Rhabdom herrührenden Fluoreszenz wurde die Retina mit einer Rasierklinge in Streifen von 100 bis  $200\mu$  Dicke zerschnitten. Bei seitlicher Lage und Quarzabdeckung dieser Retinastreifen konnten die im distalen Bereich der Ommatidien angeordneten UV-Rezeptoren getrennt von den Grünrezeptoren fluorometriert werden.

Zur Isolierung der Kristallkegel von *Ascalaphus* wurden vom Dorsalauge Kappräparate hergestellt und wie oben beschrieben

ben weiterverfahren. Auch hier wurden die gereinigten Kristallkegel in 150 mM NaCl-Lösung überführt.

## 2.5. Injektion von Ubichinon in Augen von Calliphora

---

Ubichinon (Coenzym Q10; Serva; Heidelberg) wurde mittels einer Glaskapillare (Durchmesser der Spitze ca.  $70\text{ }\mu\text{m}$ ), die über einen Polyäthylenschlauch mit einer Mikrospritze verbunden war, in Augen von auf Herzfleisch angezogenen Fliegen injiziert. Reproduzierbare Volumina von  $0.2\text{ }\mu\text{l}$  wurden durch Verwendung eines Repeating Dispensers erzielt. Unter einem Binokular wurde die Kapillare mit Hilfe eines Mikromanipulators am dorsalen Augenrand einer immobilisierten Fliege positioniert, die Cornea durchstoßen und die Probe injiziert (Schwemer 1983). Die injizierten Mengen betrugen 1, 2, 4 oder  $8\text{ }\mu\text{g}$  in Heptan gelöstes Ubichinon. Jeweils 2 Tage nach der Injektion wurden die Photorezeptoren nach der oben beschriebenen Methode präpariert und fluorometriert.

## 2.6. Lösungen

---

Für die meisten Experimente wurden 150 mM NaCl-Lösungen verwendet. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde durch Zugabe von Phosphatpuffer nach Sørensen (Stammlösungen :  $66\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ;  $66\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ) eingestellt. Zur Messung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz wurden durch Mischen der folgenden Stammlösungen gewünschte pH-Werte zwischen 8.6 und 4.7 eingestellt:

pH 8.6 : 200 mM NaCl  
          50 mM KCl  
          50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

pH 4.7 : 300 mM NaCl  
          50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Bei einigen Experimenten wurde zur Ringerlösung 50 mM Glukose hinzugefügt.

## 2.7. Herstellung von Vesikeln

---

Zur Herstellung von Phospholipidvesikeln wurden synthetisches L- $\alpha$ -Phosphatidyläthanolamin-dipalmitoyl und synthetisches L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin-dipalmitoyl (Sigma; St. Louis) verwendet. Jeweils 2 mg Phospholipid wurde in 1 ml Chloroform/Methanol (Mischungsverhältnis 1:1) gelöst.

Ubichinon wurde hauptsächlich als Coenzym Q10 (Serva; Heidelberg) ebenfalls in Chloroform/Methanol gelöst (2 mg/ml). Darüberhinaus wurden auch einige Experimente mit Coenzym Q6 (Sigma; St. Louis) und Plastochinon (freundlicherweise von Herrn Prof.Dr.Haehnel zur Verfügung gestellt) durchgeführt.

Jeweils 100  $\mu$ l der beiden Phospholipidstammlösungen und der Ubichinonlösung wurden in 2 ml Phosphatpuffer (pH-Wert 8.0) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im Stickstoffstrom unter Schütteln abgedampft. Der von organischem Lösungsmittel freie Ansatz wurde dann erneut für 10 Minuten beschallt. Die so hergestellten Vesikel wurden dann durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf; 5412) sedimentiert.

Zum Aufbau von Ionengradienten wurde nach der Zentrifugation der alkalische Überstand verworfen und durch 50 mM Zitronensäure ersetzt. Nach kurzem Aufschütteln wurde diese Suspension wiederum für 15 Minuten zentrifugiert. Nach dieser Prozedur befanden sich die im Inneren alkalischen Vesikel in einem sauren Umgebungsmedium. Zum Aufbau eines entgegengesetzten Gradienten (innen sauer - außen alkalisch) wurden die Phospholipidlösungen und die Ubichinonlösung statt in Phos-

phatpuffer in Zitronensäure gegeben, wobei dann später der Zitronensäureüberstand durch alkalischen Phosphatpuffer ersetzt wurde. Für einige Experimente wurde der alkalische Phosphatpuffer durch 50 mM Glycin ersetzt. Die so gewonnenen Vesikel wurden in Lösung auf einen Objektträger - wie alle anderen Präparate auch - durch ein silikonisiertes Quarzdeckglas so abgedeckt, daß eine Luftblase mit eingeschlossen wurde.

## 2.8. Aufnahme von Fluoreszenzspektren - Theorie

---

Zur Aufnahme eines Anregungsspektrums eines Fluorophors wird dessen Emissionsstrahlung bei einer konstanten Wellenlänge bei variiertem Anregungslicht gemessen. Dabei muß die eingestellte Meßwellenlänge langwellig gegenüber dem spektralen Variationsbereich des Anregungslichtes verschoben sein. Bei den Standardmessungen betrug die Meßwellenlänge bei Anregungswellenlängen zwischen 300 und 520nm, 568nm. Zur Aufnahme eines Emissionsspektrums wird hingegen bei konstanter Anregungswellenlänge die Meßwellenlänge variiert. Hierbei muß die Anregungswellenlänge kurzwellig gegenüber dem spektralen Variationsbereich der Meßwellenlängen verschoben sein. Bei Standardmessungen mit den Anregungswellenlängen 360, 380 oder 400nm wurde die Meßwellenlänge zwischen 430 und 700nm variiert. Für die von einem Fluorophor emittierte Strahlung  $F_A$ , gemessen bei der Wellenlänge  $\lambda_m$  (Meßwellenlänge), die durch das Licht der Wellenlänge  $\lambda_s$  (Anregungswellenlänge) angeregt wird, gilt folgende Gleichung:

$$\text{Gleichung 1: } F_A(\lambda_s, \lambda_m) = I(\lambda_s) \cdot b_s \cdot [1 - 10^{-\alpha_A(\lambda_s) \cdot c_A \cdot l}] \cdot \delta_A \cdot \beta_A(\lambda_m) \cdot b_m \cdot g(\lambda_m)$$

wobei bedeuten:

$I(\lambda_s)$  = spektrale Intensität als Funktion der Wellenlänge des Anregungslichtes

$b_0$  = Bandbreite des Anregungslichtes

$\alpha_A(\lambda_0)$  = molarer Absorptionskoeffizient des Fluorophors A

$c_A$  = Konzentration des Fluorophors A

$l$  = Schichtdicke der Probe

$\delta_A$  = Quantenausbeute des Fluorophors A

$\beta_A(\lambda_m)$  = Emissionsspektrum des Fluorophors A (Bruchteil der emittierten Quanten, die auf das spektrale Band um  $\lambda_m$  entfallen, normiert auf  $\int_0^\infty \beta(\lambda) \cdot d\lambda = 1$ )

$b_m$  = Bandbreite des analysierenden Filters

$g(\lambda_m)$  = Korrekturfaktor der Emission (Anteil von  $\beta_A$ , der vom Photonen-zähler erfaßt wird)

Gleichung 1 gilt sowohl für Anregungsspektren (wenn  $\lambda_0$  variiert und  $\lambda_m$  konstantgehalten wird) als auch für Emissionsspektren (wenn  $\lambda_0$  konstantgehalten und  $\lambda_m$  variiert wird). Der Term  $[1 - 10^{-\alpha_A(\lambda_0) \cdot c_A \cdot l}]$  gibt die Absorption des Fluorophors A an. In der Mikrospektralfluorometrie ist der Exponent dieses Terms stets wesentlich kleiner als 1. Daher ist die folgende Näherung gültig:

$$1 - 10^{-\alpha_A(\lambda_0) \cdot c_A \cdot l} \approx \alpha_A(\lambda_0) \cdot c_A \cdot l \cdot \ln 10$$

Somit vereinfacht sich Gleichung 1 zu Gleichung 2 :

$$\text{Gleichung 2 : } F_A(\lambda_0, \lambda_m) = I(\lambda_0) \cdot b_0 \cdot \alpha_A(\lambda_0) \cdot c_A \cdot l \cdot \ln 10 \cdot \delta_A \cdot \beta_A(\lambda_m) \cdot b_m \cdot g(\lambda_m)$$

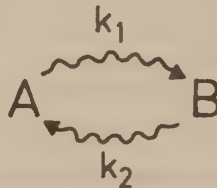
Falls die Probe mehr als einen Fluorophor enthält, ergibt sich aus der Summe der Fluoreszenzen jedes Fluorophors die Gesamtfluoreszenz  $F_0$ . Für zwei Fluorophore (A und B) gilt Gleichung 3.

Gleichung 3 :

$$\begin{aligned} F_0(\lambda_0, \lambda_m) &= F_A(\lambda_0, \lambda_m) + F_B(\lambda_0, \lambda_m) \\ &= I(\lambda_0) \cdot b_0 \cdot l \cdot \ln 10 \cdot b_m \cdot g(\lambda_m) [\alpha_A(\lambda_0) \cdot c_A \cdot \beta_A(\lambda_m) \cdot \delta_A + \alpha_B(\lambda_0) \cdot c_B \cdot \beta_B(\lambda_m) \cdot \delta_B] \end{aligned}$$

Handelt es sich bei den Fluorophoren A und B um ein photore-

versibles System, bei dem bei Belichtung mit einer Anregungswellenlänge, die überwiegend vom Fluorophor A absorbiert wird, dieser in den Fluorophor B übergeht, und umgekehrt bei Belichtung mit einer Wellenlänge, die überwiegend vom Fluorophor B absorbiert wird, dieser in den Fluorophor A übergeht, so gelten die gleichen mathematischen Beziehungen wie für die Photochemie beim Rhodopsin-Metarhodopsinsystem der Wirbellosen (Hamdorf, 1979). Handelt es sich bei den Fluorophoren also um ein photoreversibles System vom Typ:



so stellt sich bei monochromatischer Belichtung ein photochemisches Gleichgewicht ein, welches von den Absorptionskoeffizienten der Farbstoffe  $\alpha_A(\lambda_s)$  und  $\alpha_B(\lambda_s)$  bei der Wellenlänge des Adaptationslichtes  $\lambda_s$  bestimmt wird. Es gilt:

Gleichung 4:

$$c_A = c_0 \frac{\alpha_B(\lambda_s) \cdot \gamma_B}{\alpha_A(\lambda_s) \cdot \gamma_A + \alpha_B(\lambda_s) \cdot \gamma_B}; c_B = c_0 - c_A$$

wobei bedeuten:

$c_0$  = Gesamtkonzentration der Fluorophore

$\gamma_A, \gamma_B$  = Quantenausbeute der Photoumwandlung

Informationen über die spektralen Absorptions- und Emissionseigenschaften eines derartigen photoreversiblen Systems lassen sich aus der Differenz von Fluoreszenzspektren nach Einstellen verschiedener photochemischer Gleichgewichte durch Adaptation mit Lichtern der Wellenlängen  $\lambda_{s1}$  und  $\lambda_{s2}$  gewinnen. Solche Spektren können durch das folgende Verfahren gewonnen werden:

Ein frisches Präparat wird mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_1$  bis zur Einstellung eines photochemischen Gleichgewichts belichtet. Im photochemischen Gleichgewicht werden die Konzentrationen  $C_{A_1}$  und  $C_{B_1}$  der Fluorophore A und B durch Gleichung 4 beschrieben. Das Fluoreszenzspektrum  $F_{s_1}$  wird in diesem Gleichgewichtszustand aufgenommen. Dieses Spektrum wird durch Gleichung 3 beschrieben. Danach wird das Präparat bis zur Einstellung eines neuen photochemischen Gleichgewichts mit einer zweiten Adaptationswellenlänge  $\lambda_2$  belichtet. Die Konzentrationen der Fluorophore sind dann  $C_{A_2}$  und  $C_{B_2}$ . In dieser Situation wird ein zweites Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Differenz zwischen den beiden Fluoreszenzspektren ( $F_{s_2}$  minus  $F_{s_1}$ ) nennen wir Fluoreszenzdifferenzspektrum  $\Delta F_s$ , welches durch Gleichung 5 beschrieben wird :

Gleichung 5 :

$$\Delta F_s(\lambda_s, \lambda_m) = I(\lambda_s) \cdot b_s \cdot l \cdot \ln 10 \cdot b_m \cdot g(\lambda_m) \cdot (C_{A_2} - C_{A_1}) \cdot [\alpha_A(\lambda_s) \cdot \beta_A(\lambda_m) \cdot \delta_A - \alpha_B(\lambda_s) \cdot \beta_B(\lambda_m) \cdot \delta_B]$$

Aus Gleichung 5 folgt, daß die Amplituden von Fluoreszenzdifferenzspektren immer proportional der Differenz der Konzentrationen ( $C_{A_2}$  minus  $C_{A_1}$ ) der beiden Gleichgewichtseinstellungen sind. Dies gilt für beide Typen von Differenzspektren, für das Anregungsdifferenz- ( $\Delta F_s(\lambda_s)$ ) und für das Emissionsdifferenzspektrum ( $\Delta F_s(\lambda_m)$ ). Da sich die spektralen Strukturen von Anregungsdifferenzspektren und Emissionsdifferenzspektren unterscheiden, müssen die weiteren Eigenschaften der beiden Differenzspektren getrennt betrachtet werden.

### 2.8.1. Anregungsdifferenzspektrum $\Delta F_s(\lambda_s)$

---

Um ein Anregungsdifferenzspektrum zu erhalten, wird bei konstanter Meßwellenlänge  $\lambda_m$  die Anregungswellenlänge  $\lambda_s$  variiert. Die Gestalt des Anregungsdifferenzspektrums hängt von der Wahl

der Meßwellenlänge  $\lambda_m$  ab. Wählt man für  $\lambda_m$  einen Spektralbereich, in dem nur einer der Fluorophore - A oder B - Licht emittiert, so entspricht dieses Differenzspektrum dem Anregungsspektrum dieses einen Fluorophors. Liegt  $\lambda_m$  in dem Spektralbereich, wo beide Fluorophore Licht emittieren, so erhält man ein Differenzspektrum mit charakteristischem Minimum, Maximum und Nulldurchgang. Den Nulldurchgang nennen wir Isoexzitationspunkt  $\lambda_{eis0}$ . In diesem Bereich, wo sich die Emissionen überlagern, verschieben sich die spektralen Orte größter Amplituden von Minimum und Maximum sowie der Isoexzitationspunkt  $\lambda_{eis0}$  bei Variation der Meßwellenlänge  $\lambda_m$ . Am Isoexzitationspunkt gilt folgende Beziehung:

$$\alpha_A(\lambda_{eis0}) \cdot \beta_A(\lambda_m) \cdot \delta_A = \alpha_B(\lambda_{eis0}) \cdot \beta_B(\lambda_m) \cdot \delta_B$$

## 2.9.2. Emissionsdifferenzspektrum $\Delta F_e(\lambda_m)$

Um ein Emissionsspektrum aufzunehmen, wird bei konstanter Anregungswellenlänge  $\lambda_0$  die Meßwellenlänge  $\lambda_m$  variiert. Das Aussehen des Emissionsdifferenzspektrums hängt von der Wahl der Anregungswellenlänge  $\lambda_0$  ab. Liegt  $\lambda_0$  in dem Spektralbereich, in dem nur einer der Fluorophore - A oder B - Licht absorbiert, entspricht dieses Differenzspektrum dem reinen Emissionsspektrum dieses absorbierenden Fluorophors. Liegt  $\lambda_0$  in dem Bereich, wo beide Fluorophore Licht absorbieren, so zeigt das Differenzspektrum ein charakteristisches Maximum und Minimum sowie einen Nulldurchgang. Diesen Nulldurchgang nennen wir Isoemissionspunkt  $\lambda_{mis0}$ . In diesem Bereich der sich überlappenden Absorptionen verschieben sich Maximum, Minimum und die Lage des Isoemissionspunktes mit variierender Anregungswellenlänge  $\lambda_0$ . Am Isoemissionspunkt gilt die folgende

Beziehung :

$$\alpha_A(\lambda_s) \cdot \beta_A(\lambda_{mis0}) \cdot \delta_A = \alpha_B(\lambda_s) \cdot \beta_B(\lambda_{mis0}) \cdot \delta_B$$

## 2.9. Korrektur der gemessenen Fluoreszenzspektren

---

Um die tatsächlichen Anregungs- oder Emissionsspektren zu erhalten, sind die gemessenen Spektren zu korrigieren. Die Art der nötigen Korrekturen folgt aus Gleichung 2.

1. Die Form des aufgenommenen Anregungsspektrums  $F_A(\lambda_s)$  wird durch die Ausdrücke in Gleichung 2 bestimmt, die von  $\lambda_s$  abhängig sind. Zum Beispiel :

$$F_A(\lambda_s) \sim I(\lambda_s) \cdot \alpha_A(\lambda_s)$$

Das wahre Anregungsspektrum  $\alpha_A(\lambda_s)$  erhält man durch Division von  $F_A(\lambda_s)$  durch das Intensitätsspektrum der Anregungslichtquelle  $I(\lambda_s)$ . Dieses Intensitätsspektrum ist in Abb.2 gezeigt, der Effekt der Korrektur hingegen in Abb.4.

2. Die Form des aufgenommenen Emissionsspektrums  $F_A(\lambda_m)$  wird durch die Ausdrücke in Gleichung 2 bestimmt, die von  $\lambda_m$  abhängig sind. Zum Beispiel :

$$F_A(\lambda_m) \sim \beta_A(\lambda_m) \cdot g(\lambda_m)$$

Das wahre Emissionsspektrum  $\beta_A$  eines Fluorophors A kann durch Division von  $F_A(\lambda_m)$  durch den Korrekturfaktor  $g(\lambda_m)$  errechnet werden. Der relative Korrekturfaktor  $g(\lambda_m) / g_{max}$  ist hierzu ausreichend. Dieser relative Korrekturfaktor kann durch den Vergleich eines aufgenommenen Emissionsspektrums von Chininsulfat mit dessen tatsächlichem Emissionsspektrum ermittelt werden (standardisierte Methode für fluoreszierende Lösungen; White und Argauer 1970). Beide Spektren sowie der errechnete Korrekturfaktor sind in Abb.3 gezeigt und der Effekt der Korrektur auf untersuchte Fluorophorsysteme in Abb.4 (Kurve b). Die diskutierten Korrekturen  $I(\lambda_s)$  und  $g(\lambda_m)$  wurden nicht routine-

mäßig durchgeführt. Sie wurden nur verwendet, um die tatsächlichen Anregungs- und Emissionsspektren der untersuchten Fluorophorsysteme zu ermitteln.

#### 2.10. Berechnung der absoluten von den Fluorophoren emittierten Photonzahlen

-----

Da von der Meßapparatur aufgrund ihrer optischen Eigenschaften nur ein Teil der von einer fluoreszierenden Struktur emittierten Photonen registriert wird, muß zur Bestimmung der tatsächlich emittierten Photonzahl der Korrekturfaktor  $g(\lambda_m)$  aus Gleichung 1 bekannt sein. Dieser gibt den kleinen Anteil der von der Meßapparatur erfassten zur von der Probe emittierten Photonen wieder. Die Abhängigkeit des normierten Korrekturfaktors  $g(\lambda_m)$  von der Wellenlänge läßt sich wie bereits oben beschrieben experimentell ermitteln. Um die absoluten Werte der Funktion  $g(\lambda_m)$  zu erhalten, muß nur noch  $g_{max}$  bestimmt werden.  $g_{max}$  wird von folgenden optischen Komponenten bestimmt : 1. von dem durch die numerische Apertur des Objektivs bestimmten Öffnungswinkel, 2. durch die Transmission von Linsen, Spiegeln und Filtern im Strahlengang und 3. durch die Empfindlichkeit des Photonenzählrohrs. Die Berechnung von  $g_{max}$  aufgrund dieser Faktoren ergab für das Objektiv 10x  $1.3 \times 10^{-4}$  und  $6 \times 10^{-3}$  für das Objektiv 40x. Da eine derartige Überschlagsrechnung relativ unsicher ist, wurde zusätzlich  $g_{max}$  direkt bestimmt. Hierzu wurde das bekannte Emissionsspektrum des Fluorophors Chininsulfat (Q) bei der Anregungswellenlänge 370 nm mit der Apparatur von Abb.1 aufgenommen. Für ein konstantes  $\lambda_e$  ( $=370$  nm) kann  $g_{max}$  über die Umformung von Gleichung 2 ermittelt werden. Für  $g_{max}$  muß Gleichung 6 gelten:

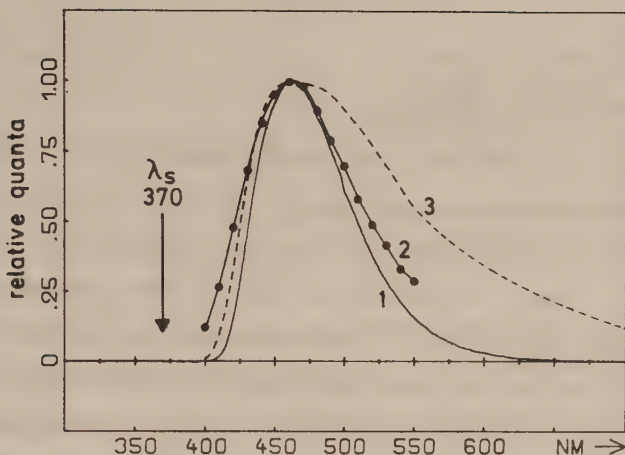


Abb. 3

Bestimmung des relativen Korrekturfaktors  $g(\lambda_m) / g_{max}$  zur Korrektur der Emissionsspektren. Kurve 1: Mit der Meßapparatur aufgenommenes Emissionsspektrum einer Chininsulfatlösung ( $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  in  $0.05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ; Schichtdicke  $0.3 \text{ mm}$ ; Anregungswellenlänge  $370 \text{ nm}$ ; K430 als Kantenfilter EF). Kurve 2: Wahres Emissionsspektrum von Chininsulfat (White und Argauer, 1970). Kurve 3: Errechneter relativer Korrekturfaktor  $g(\lambda_m) / g_{max}$ . Oberhalb  $550 \text{ nm}$  wurde der Korrekturfaktor mit der bekannten Änderung der spektralen Empfindlichkeit des Photonenzihlrohrs korrigiert.

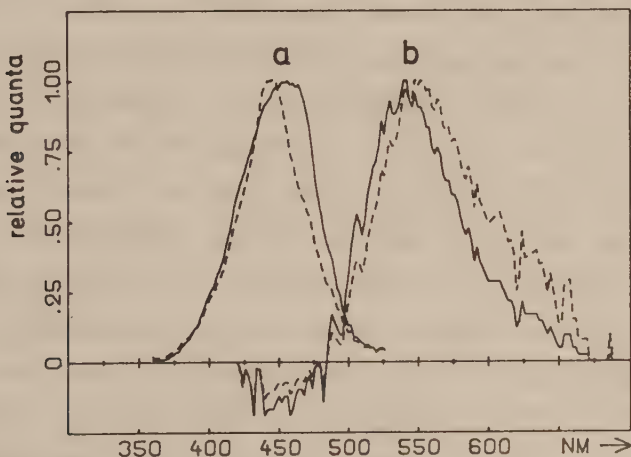


Abb. 4

Auswirkung der Korrekturen auf gemessene Fluoreszenzspektren. Durchgezogene Linien: gemessene Spektren. Unterbrochene Linien: Korrigierte Spektren. Kurve a: Anregungsdifferenzspektrum der Fluoreszenz von Rhabdomeren der Fliege, die Absorptionseigenschaften des Fluorophors  $B_R$  beschreibend (Daten aus Abb. 13b, Kurve 2-1). Kurve b: Emissionsdifferenzspektrum der Fluoreszenz der Rhabdomere, das Emissionsspektrum des Fluorophors  $B_R$  beschreibend (Daten aus Abb. 16;  $\lambda_m = 400 \text{ nm}$ ). Beide korrigierten Spektren sind ebenfalls in Abb. 17 gezeigt.

Gleichung 6:

$$g_{\max} = \frac{\frac{1}{\delta_m} \int F_Q(\lambda_m) \cdot \frac{g_{\max}}{g(\lambda_m)} d\lambda_m}{I_{370} \cdot b_g \cdot [\alpha_Q(370) \cdot c_Q \cdot l \cdot \ln 10] \cdot \delta_Q}$$

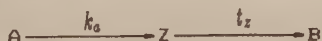
Um  $g_{\max}$  zu erhalten, muß das Emissionsspektrum über seinen gesamten Spektralbereich integriert werden. Nach Integration von Gleichung 2 verschwindet dann der Ausdruck  $\beta_Q(\lambda_m)$ , da sein Integral 1 ist. Die Messung wurde mit einer 125 mM Chininsulfatlösung, gelöst in 50 mM Schwefelsäure durchgeführt. Die Probe wurde zwischen zwei Deckgläschen eingeschlossen, die einen lichten Abstand von  $l=116 \mu\text{m}$  hatten. Das Anregungslicht ( $\lambda_g=370\text{nm}$ ), begrenzt durch die Irisblende (DIV), wurde durch das Objektiv 10x in der Objektebene als eine Kreisfläche mit einem Durchmesser von  $113 \mu\text{m}$  abgebildet. Das Abbild dieser Fläche in der Blendenebene (DI) war wesentlich kleiner (Durchmesser  $1,3 \text{ mm}$ ) als deren Öffnung (Durchmesser  $2 \text{ mm}$ ), so daß DI nicht begrenzend wirkte. Das Emissionsspektrum dieser Chininsulfatlösung ist in Abb.3 gezeigt. Integration des aufgenommenen Emissionsspektrums ergab nach Division durch die Bandbreite des Verlaufslinienfilters ( $b=18\text{nm}$ )  $2.6 \times 10^5$  Photonen  $\times \text{s}^{-1}$ . Die Absorption der Probe, die dem Klammerausdruck von Gleichung 6 entspricht, wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz für eine 50 mM Chininsulfatlösung berechnet. Die Absorption wurde in einem konventionellen Photometer (Zeiss; DM 4;  $\lambda_m=370 \text{ nm}$ ,  $l=10 \text{ mm}$ ) gemessen und zu 0.35 bestimmt. Umrechnung der Werte auf die Konzentration und Schichtdicke der Probe (125mM,  $116 \mu\text{m}$ ) ergaben eine Absorption von 0.023. Für die Quantenausbeute von Chininsulfat ist 0.55 anzusetzen (Melhuish 1964), und für die Intensität des Anregungslichtes  $I_{370} \cdot b_g$  wurde nach Messung mit der Thermosäule ein Wert von  $74.5 \times 10^9$  Photonen  $\times \text{s}^{-1}$  bestimmt. Nach Einsetzen dieser Daten

in Gleichung 6 ergab sich für  $f_{max}$  ein Wert von  $2.9 \times 10^{-4}$ . Dies ist der Anteil der gesamten von der Probe emittierten Strahlung, der von der Meßapparatur erfaßt wird.

## 2.11. Kinetik der photochemischen Umwandlung eines Fluorophors

### A in einen Fluorophor B

Ein System aus zwei Fluorophoren, deren Anregungs- und Emissionsspektren sich teilweise überlappen und das bei Belichtung von einem Fluorophor A in den zweiten Fluorophor B übergeht, läßt sich bei Wahl geeigneter Versuchsbedingungen an Hand der Fluoreszenzkinetik näher charakterisieren. Bei derartigen Versuchen werden Bestrahlungswellenlänge  $\lambda_i$  und Meßwellenlänge  $\lambda_m$  so gewählt, daß sie im Überlappungsbereich der Anregungs- bzw. der Emissionsspektren liegen. Die Lage der Wellenlängen  $\lambda_i$  und  $\lambda_m$  bestimmt dann, ob es bei Belichtung zu einer Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz kommt. Handelt es sich bei der Umwandlung um einen einfachen Übergang nach dem Schema  $A \xrightarrow{k} B$ , wird die Fluoreszenz mit einer einfachen e-Funktion abnehmen. Kommt es aber zunächst zu einer Abnahme der Fluoreszenz und dann zu einem erneuten Anstieg bis zu einem stationären Endwert, muß ein anderes Reaktionsprinzip vorliegen. Eine derartige diphasische Fluoreszenzkinetik mit Minimum kann bereits in dem Fall auftreten, wenn bei dem Übergang von A nach B zunächst ein Zwischenprodukt Z entsteht, welches entweder gar nicht oder schwächer fluoresziert als A und/oder B; also folgendes Reaktionsschema gilt :



Für dieses Reaktionsschema gelten folgende Differentialgleichungen, wenn  $A + Z + B = A_0$  ist:

$$1) \quad \frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A$$

$$2) \quad \frac{dZ}{dt} = k_a \cdot A - t_z \cdot Z$$

$$3) \quad \frac{dB}{dt} = t_z \cdot Z$$

wobei die Geschwindigkeitsgröße  $k_a$  von Strahlungsintensität  $I$ , Wellenlänge  $\lambda_s$ , molarem Absorptionskoeffizienten  $\alpha_A$  und Quantenausbeute  $\gamma_A$  wie folgt abhängt :

$$k_a = I(\lambda_s) \cdot \alpha_A(\lambda_s) \cdot \gamma_A$$

Integration der Differentialgleichungen liefert die Änderung der Konzentrationen von A, B und Z im Laufe der Belichtungsdauer  $t$ . Besteht zur Zeit  $t = 0$  die Anfangsbedingung

$A = A_0 = 1$ , erhält man die folgenden Funktionen :

$$a) \quad A(t) = A_0 \cdot e^{-k_a \cdot t}$$

$$b) \quad Z(t) = \frac{k_a \cdot A_0}{k_a - t_z} \cdot (e^{-t_z \cdot t} - k_a \cdot e^{-k_a \cdot t})$$

$$c) \quad B(t) = A_0 + \frac{A_0}{k_a - t_z} \cdot (t_z \cdot e^{-k_a \cdot t} - k_a \cdot e^{-t_z \cdot t})$$

Die Zeitfunktionen der A -, B - und Z - Konzentrationen sind beispielhaft für den Fall  $A_0 = 1$  und gleichschnelle photochemische und thermische Reaktionsgeschwindigkeiten ( $k_a = t_z$ ) in Abbildung 5 wiedergegeben.

Da der Übergang von A nach Z durch Quantenabsorption induziert wird, ist die Geschwindigkeitsgröße  $k_a$  direkt proportional der Bestrahlungsintensität und somit beliebig variabel gegenüber der thermischen Geschwindigkeitskonstante  $t_z$ . Zu einer deutlichen zwischenzeitlichen Anhäufung des Zwischenproduktes Z kommt es nur dann, wenn die Strahlungsintensität hinreichend groß gewählt wird, wenn also die Geschwindigkeitsgröße  $k_a$  etwa gleich oder größer als  $t_z$  wird. Bei Vorliegen des obigen Reaktionsmodells ist also zu fordern, daß mit stei-

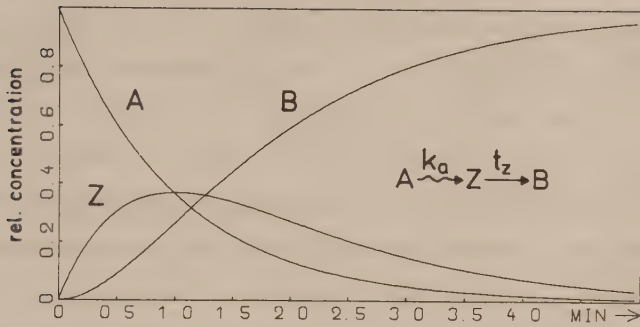


Abb.5

Modellrechnung für die Zeitfunktionen der A-, B- und Z-Konzentrationen für den Fall  $A_0 = 1$  und gleichschneller photochemischer und thermische Reaktionsgeschwindigkeit ( $k_a = t_z$ ) bei Belichtung, die ausschließlich von A absorbiert wird.

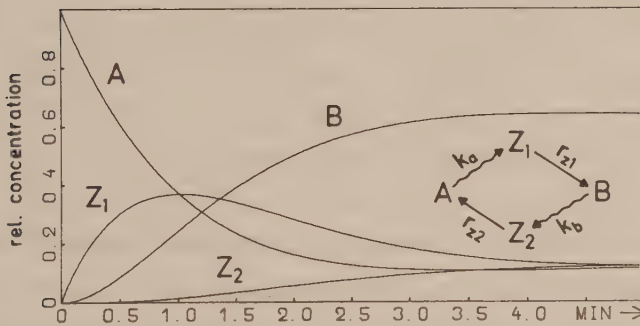
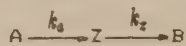


Abb.6

Modellrechnung für den Konzentrationsverlauf von A, B, Z<sub>1</sub> und Z<sub>2</sub> bei monochromatischer Belichtung, die von A stärker absorbiert wird als von B, ausgehend von  $A = A_0 = 1$  zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Die intensitätsabhängige Geschwindigkeitskonstante  $k_a$  wurde gleich groß den thermischen Konstanten gewählt ( $k_a = r_{z1} = r_{z2}$ ). Weiterhin wurde bei konstanter Quantenausbeute der Fluoreszenz ( $\delta_A = \delta_B$ ) ein  $k_a / k_b$  - Geschwindigkeitsverhältnis von 5:1 angenommen.

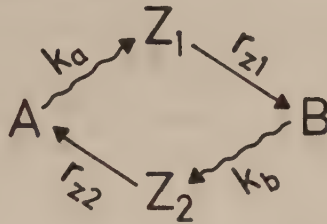
gender Strahlungsintensität die Maximalamplitude der Z-Konzentration zunehmend wächst und sich dabei vorverlagert. Wird zur Anregung eine Wellenlänge ( $\lambda_0$ ) verwendet, die etwa gleiche Fluoreszenz bei den Stoffen A und B, aber keine oder geringere bei Produkt Z auslöst, wird in der Fluoreszenzkinetik ein Minimum auftreten und zwar während der zwischenzeitlichen Anhäufung von Z. Weiter ist zu erwarten, daß sich dieses Fluoreszenzminimum mit steigender Strahlungsintensität vertieft. Ein ähnliches Verhalten der Fluoreszenzkinetik mit zwischenzeitlichem Minimum ist auch von einem reinen photochemischen Reaktionsmodell des Typs



zu erwarten, jedoch sollte hier die Tiefe des Minimums konstant, also intensitätsunabhängig sein. Denn, wenn  $k_2$  gleichermaßen wie  $k_0$  durch Steigerung der Intensität beschleunigt wird, also  $k_2/k_0$  konstant ist, verkürzt sich nur die Zeitspanne bis zum Erreichen der Maximalkonzentration von Z, ihre Amplitude bleibt jedoch konstant. Letzteres ist also ein klares Unterscheidungsmerkmal für diese beiden Modelle. Als zweites Unterscheidungsmerkmal der beiden Reaktionsmodelle kann das unterschiedliche Temperaturverhalten dienen. Das zweite rein photochemische Modell muß im physiologischen Bereich temperaturunabhängig, das erste Modell dagegen stark temperaturabhängig sein, da erwartungsgemäß  $t_0$  mit einem  $Q_{10}$  von 2 bis 3 variiert.

In photoreversiblen Fluorophorsystemen ist, analog zum obigen Modell auch für die Rückreaktion ein Zwischenprodukt  $Z_2$  anzunehmen. Für derartige photoreversible Systeme ist folgendes Grundschemata anzunehmen, das sich ebenfalls durch einen

Satz linearer Differentialgleichungen beschreiben, jedoch nicht allgemein lösen läßt:



Durch eingehende numerische Analyse wurde gezeigt, daß auch bei diesen reversiblen Systemen diphasische Kinetiken mit intensitätsmodulierten Minima die Regel sind. Die Abbildungen 6 und 7 geben ein einfaches Beispiel derartiger Modellrechnungen wieder, nämlich für den Fall gleichschneller Dunkelreaktionen ( $r_{z1} = r_{z2} = 1$ ), eines  $k_0 / k_1$ -Geschwindigkeitsverhältnisses von 5 : 1 und gleich großer Quantenausbeute der Fluoreszenz ( $\delta_A = \delta_B$ ). Abbildung 6 zeigt den Konzentrationsverlauf der vier Produkte ausgehend von  $A = A_0 = 1$  zum Zeitpunkt  $t = 0$ , wenn die intensitätsabhängige GröÙe  $k_0$  gleich groß den thermischen Reaktionskonstanten gewählt wird ( $k_0 = r_{z1} = r_{z2}$ ). Wie aus den Verläufen zu ersehen, führt auch bei diesen Systemen der schnelle exponentielle Abfall von A zur zwischenzeitlichen Anhäufung des Belichtungsproduktes  $Z_1$ .

Fluoreszieren die Zwischenprodukte gering im Vergleich zu den Stoffen A und B ( $\delta_A = \delta_B$ ), bedingt diese zwischenzeitliche Anhäufung von  $Z_1$  Kinetiken mit Minima, die sich mit steigender Intensität vertiefen und vorverlagern. Die Amplitude der Fluoreszenz nach Einstellung des photochemischen Gleichgewichts ist in dem speziellen Beispiel der Abbildung 7 niedriger als zu Beginn der Reaktion zum Zeitpunkt  $t_0$ . Sie wird jedoch größer, wenn entweder  $\delta_A < \delta_B$  und/oder  $\alpha_A(\lambda_0) < \alpha_B(\lambda_0)$  wird. Sie

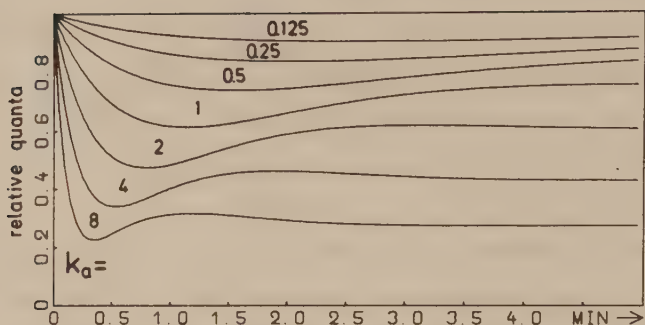


Abb. 7

Modellrechnung für den Zeitverlauf der Gesamtfluoreszenz von A und B für verschieden große Geschwindigkeitskonstanten  $k_a$  im Falle gleichschneller Dunkelreaktionen ( $r_{z1} = r_{z2} = 1$ ), einem  $k_a / k_b$ -Geschwindigkeitsverhältnis von 5:1 und gleicher Quantenausbeute ( $\delta_A = \delta_B$ ).

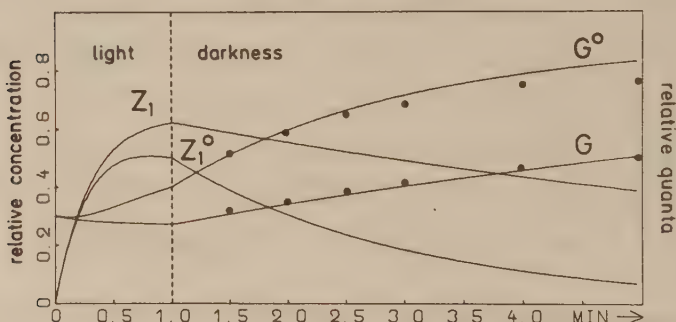


Abb. 8

Modellrechnung für den Zeitverlauf der Gesamtfluoreszenz (Kurven G,  $G^0$ ; rechte Skala) und der Konzentration des Zwischenprodukts  $Z_1$  (linke Skala) während UV-Belichtung (0 bis 1. Min) und darauf folgender Dunkelperiode bei zwei verschiedenen Temperaturen. Der Modellrechnung liegen folgende Relationen der Geschwindigkeiten zugrunde:  $k_a / k_b = 10$ ,  $r_{z1} / r_{z2} = 0.2$ , und als absolute Geschwindigkeitsgrößen  $k_a = 3$ ,  $r_{z1} = 0.125$  bei niedriger Temperatur und  $r_{z1} = 0.5$  bei höherer Temperatur. Bei höheren Temperaturen wird schon während der Belichtung  $Z_1$  in B überführt und dieses durch Licht partiell in  $Z_2$  umgewandelt. Daher ist bei Belichtungsende  $Z_1^0$  niedriger als  $Z_1$ . Der Anstieg der Fluoreszenz in der Dunkelperiode ist dann direkt proportional dem Abbau von  $Z_1$ . Die Kurven sind an die Meßpunkte von Abb. 21 approximiert (Punkte).

ist weiter abhängig von der Wahl der Meßwellenlänge  $\lambda_m$ .

Ähnliches Verhalten ist auch von rein photochemischen Kreisprozessen zu erwarten, bei denen auch die Produkte  $Z_1$  und  $Z_2$  photochemisch ( $k_{z_1}$ ,  $k_{z_2}$ ) in B bzw. in A übergehen. In diesen Fällen ist aber die Amplitude des Minimums wie bei den erstgenannten Modellfällen konstant und die Kinetiken sind wiederum temperaturunabhängig.

Bei dem diskutierten photoreversiblen System mit eingeschlossenen thermischen Dunkelreaktionen kann es bei höheren Temperaturen zu einer stärkeren Anhäufung des Fluorophors B als bei niedrigen kommen, nämlich dann wenn die photochemische Hinreaktion schneller verläuft als die photochemische Rückreaktion, hingegen die thermische Hinreaktion langsamer ist als die thermische Rückreaktion. Unter diesen Bedingungen wird bei höheren Temperaturen schon während der Belichtung mehr Zwischenprodukt  $Z_1$  nach B überführt und dieses partiell durch Licht in  $Z_2$  umgewandelt. Aus diesem Grunde ist bei Belichtungsende  $Z_1^0$  (höhere Temperatur) niedriger als  $Z_1$ . In der Dunkelperiode ist dann der Anstieg der Fluoreszenz direkt proportional dem Abbau von  $Z_1$ . Solche Konzentrationsverläufe sind mit der in Abbildung 8 gezeigten Computersimulation für  $Z_1$  und B demonstriert. Für zwei unterschiedliche Temperaturen wurde  $r_{z_1}$  zu 0.12 und 0.5 gewählt. Für das  $k_a / k_b$ -Geschwindigkeitsverhältnis wurde 10, für das  $r_{z_1} / r_{z_2}$ -Geschwindigkeitsverhältnis 0.2 angenommen. Die Quantenausbeute der Fluoreszenz wurde gleich groß ( $\delta_A = \delta_B$ ) gewählt.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.1. Qualitative Beobachtungen

---

Die ersten Untersuchungen basierten auf subjektiven Beobachtungen mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop. Sowohl durch UV- als auch durch Blaustrahlung ließ sich bei *Deilephila* und *Calliphora* die Cornea zu blau-grüner Fluoreszenz anregen (Abb.9). Sehr auffällig waren bei *Calliphora* außerdem eine grünliche Fluoreszenz der Semperzellen und eine blaue Fluoreszenz der Tracheolen in unmittelbarer Nähe der Photorezeptoren Sieben und Acht. Die Fluoreszenzen dieser Organelle erschienen unter diesen Beobachtungsbedingungen als relativ stabil und nahmen in ihrer Intensität erst nach längeren Beobachtungsperioden sichtbar ab (Abb.9b).

Eine verblüffende Modulation der Fluoreszenz war dagegen an den Rhabdomeren von *Calliphora* zu beobachten. Wurden dunkeladaptierte Rhabdomere zunächst mit blauem Anregungslicht bestrahlt, so emittierten sie eine gelbgrüne Fluoreszenz niedriger Intensität (Abb.10). Nach einer zwischenzeitlichen UV-Belichtung war diese durch Blau angeregte Fluoreszenz erheblich stärker, um dann innerhalb einiger Sekunden wieder an Intensität zu verlieren. Diese vorübergehende Intensitätszunahme der durch Blau angeregten Fluoreszenz ließ sich durch wiederholte UV-Belichtungen mehrfach wiederholen. Dieses Phänomen war der erste Hinweis auf die Existenz eines photoreversiblen Fluorophorsystems, das entweder in den Rhabdomeren selbst oder in deren unmittelbarer Umgebung lokalisiert ist.

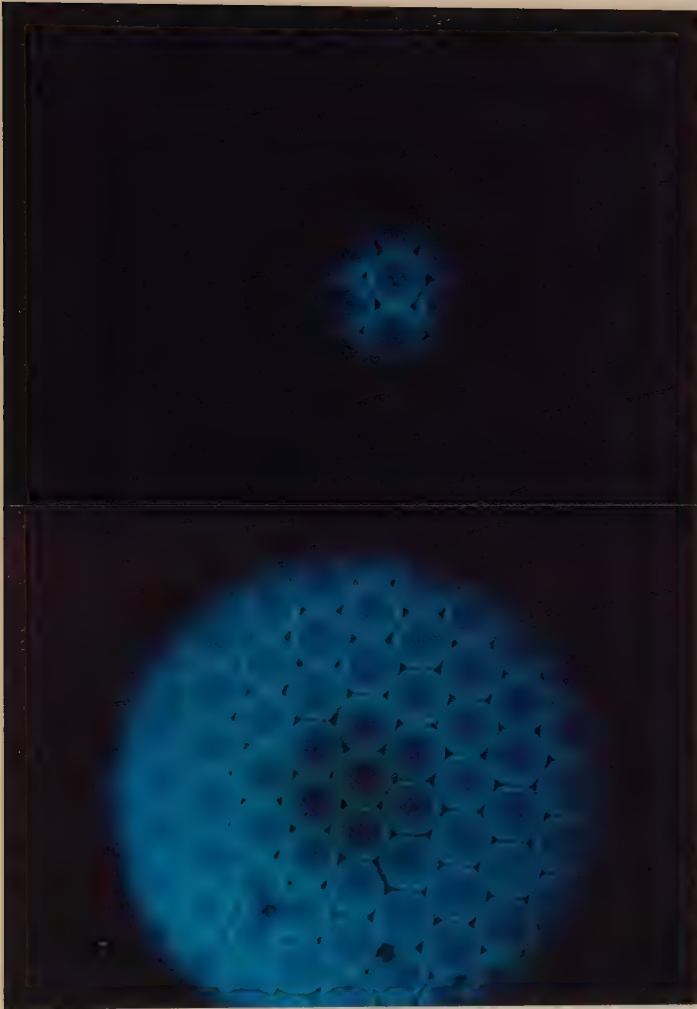


Abb.9  
Fluoreszenz der Cornea von *Deilephila* in vivo bei UV-Anre-  
gung. Kantenfilter EF = K460. a. Zentralbereich der Cornea.  
b. Cornea nach Aufweitung der variablen Irisblende DIV. Be-  
achte die verminderte Fluoreszenz des schon vorher belichte-  
ten Corneabereichs.



Abb.10

Isoliertes Ommatidium der Fliege (Diät II) mit anhaftendem Kristallkegel bei rotem Hintergrundlicht und additiver Blaustrahlung zur Anregung der Fluoreszenz (Kantenfilter EF=K530). a. Dunkeladaptiertes Ommatidium. Hier ist keine Fluoreszenz zu erkennen. b. Nach vier Minuten UV-Adaptation. Es ist eine deutliche gelbe Fluoreszenz der einzelnen Rhabdomere sichtbar. Die Fluoreszenz verlor erheblich innerhalb weniger Sekunden an Intensität, war aber durch erneute UV-Adaptation mehrfach regenerierbar.

### 3.2. Das Fluorophorsystem der Rhabdomere der Fliege

---

#### 3.2.1. Photokinetik der Fluorophore

---

Zur genaueren Analyse dieses Fluorophorsystems wurde der Zeitverlauf der Fluoreszenz bei der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 520\text{nm}$  aufgezeichnet (Abb.11). Wie in Spur 1 gezeigt, regte Blaustrahlung eine schwache Fluoreszenz an, deren Intensität innerhalb von etwa 30 Sekunden auf einen Endwert abfiel. Bei UV-Belichtung zeigte der Zeitverlauf der Fluoreszenz hingegen ein vollkommen anderes Verhalten. Die Intensität nahm erst auf einen Minimalwert ab, um anschließend langsam wieder anzusteigen (Abb.11a, Spur 2). Etwa fünf Minuten nach Beginn der UV-Belichtung wurde ein Maximalwert erreicht, der konstant blieb. Gewöhnlich überstieg diese Endintensität den Ausgangswert. Dieser Zeitverlauf weist auf einen diphasischen Prozess hin. Direkt nach der UV-Belichtung wurde das Präparat mit Blaustrahlung der gleichen Intensität wie zu Versuchsbeginn angeregt. Dieser erneute Blaustimulus (Spur 3) löste eine wesentlich stärkere Fluoreszenz von etwa zwanzigfach höherer Intensität als zu Beginn aus. Dieser, durch die vorangegangene UV-Belichtung induzierte Effekt ist war von kurzer Dauer. Innerhalb von etwa 30 Sekunden fiel die Fluoreszenzintensität auf ein Drittel ihres Ausgangswertes ab (Spur 3) und erreichte nach etwa zwei weiteren Minuten wieder den Wert, der zu Versuchsbeginn registriert worden war (letzteres nicht gezeigt in Abb.11a). Die initiale Intensität der durch Blau angeregten Fluoreszenz ist abhängig von der Dauer der voraufgegangenen UV-Belichtung. Wie in Abb.11b gezeigt, war die initiale Intensität nach 150s UV-Vorbelichtung um etwa ein Drittel kleiner als nach 300s UV-Vorbelichtung. Im Laufe der Anregung

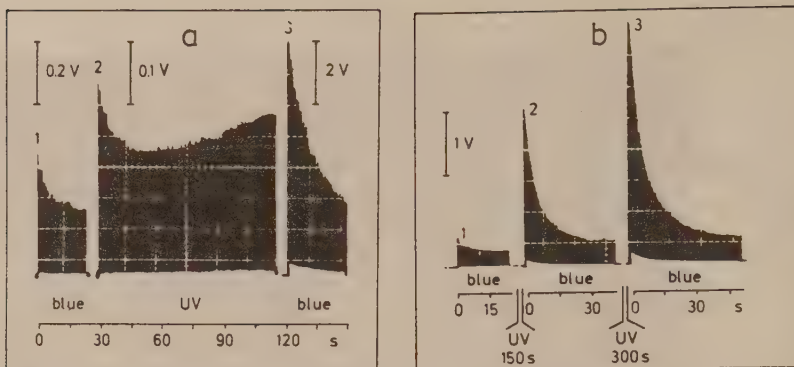


Abb. 11

Kinetik der Fluoreszenz isolierter Rhabdomere der Fliege (Meßwellenlänge 520nm; Diät II). Die Fluoreszenz wurde mit pulsierendem Licht (100 Hz) der Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 200 W) angeregt. Die Registrierungen sind demgemäß Zeitverläufe von 100 Hz Fluoreszenzspulen. a. Zeitverlauf der Fluoreszenz bei alternierender Blau- und UV-Anregung. Spur 1: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz dunkeladaptierter Rhabdomere bei Blauanregung. Spur 2: Abnahme und nachfolgender Anstieg der Fluoreszenzintensität während 90s UV-Anregung. Spur 3: Abnahme der Fluoreszenz bei Blauanregung unmittelbar nach Ende der vorangegangenen UV-Anregung. Beachte die zehnfach geringere Verstärkung in Spur 3 gegenüber Spur 1. Dies bedeutet eine etwa zwanzigfach höhere Fluoreszenzintensität nach UV-Adaptation. b. Blauangeregte Fluoreszenz vor und nach UV-Adaptation. Spur 1: Dunkeladaptierte Rhabdomere. Spur 2: Nach 150s UV-Adaptation. Spur 3: Nach 300s UV-Adaptation. Beachte die Abhängigkeit der blauangeregten Fluoreszenz von der Dauer der UV-Adaptation.

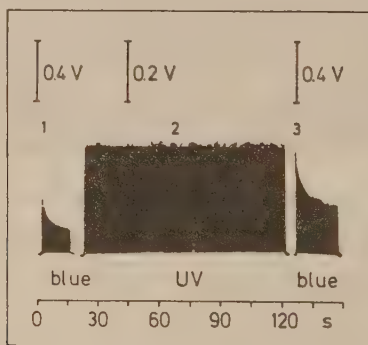


Abb. 12

Kinetik der Fluoreszenz isolierter Rhabdomere des Wildtyps der Fliege (Meßwellenlänge 520nm; Diät Herz) bei alternierender Blau- und UV-Anregung. Spur 1: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz bei Blauanregung. Spur 2: Fluoreszenz während 90s UV-Anregung. Spur 3: Abnahme der Fluoreszenz bei Blauanregung unmittelbar nach Ende der UV-Anregung. Beachte den konstanten Verlauf der UV-angeregten Fluoreszenz und die Verdopplung der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Anregung.

mit Blau nahm die Fluoreszenz auf den gleichen Endwert ab. Dieser Verlauf der Fluoreszenz konnte mindestens zwölfmal durch alternierende UV- Blau- Belichtungen wiederholt werden.

Diese Modulationen in der Fluoreszenz weisen auf ein photoreversibles System aus zwei Fluorophoren hin, das in den Rhabdomeren lokalisiert ist. In diesem System wird ein primärer Fluorophor  $A_R$ , der in dunkeladaptierten Rhabdomeren vorliegt, durch UV-Belichtung in einen Folgefluorophor  $B_R$  überführt. Durch eine anschließende Blaubelichtung kann der Folgefluorophor  $B_R$  wieder in den Ausgangsfluorophor  $A_R$  rückverwandelt werden.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, sind auch in den Photorezeptoren des Wildtyps ähnliche Kinetiken nachweisbar. Die durch UV-Adaptation erzielbaren Modulationen der durch blau anregbaren Fluoreszenz waren allerdings erheblich geringer.

### 3.2.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

---

Zur genaueren Analyse der Absorptionseigenschaften wurden Anregungsspektren von isolierten Rhabdomen aufgenommen. Anregungsspektren des im Blauen absorbierenden Fluorophors  $B_R$  wurden bei der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 570\text{nm}$  aufgenommen, da in diesem Spektralbereich fast ausschließlich dieser Fluorophor emittiert (Abb.13). Zuerst wurde das Anregungsspektrum eines dunkeladaptierten Rhabdomers registriert (Kurve 1). Dieses Spektrum wies ein schwaches Maximum im UV-Bereich, schwache Hintergrundfluoreszenz in der Region von 400 bis 480nm und einen allmählichen Anstieg der Fluoreszenz ab 480nm auf. Der Anstieg der Fluoreszenz ab etwa 520 nm beruhte auf Falschlicht, das das Sperrfilter (EF oberhalb MQ; Abb.1) passieren konnte.

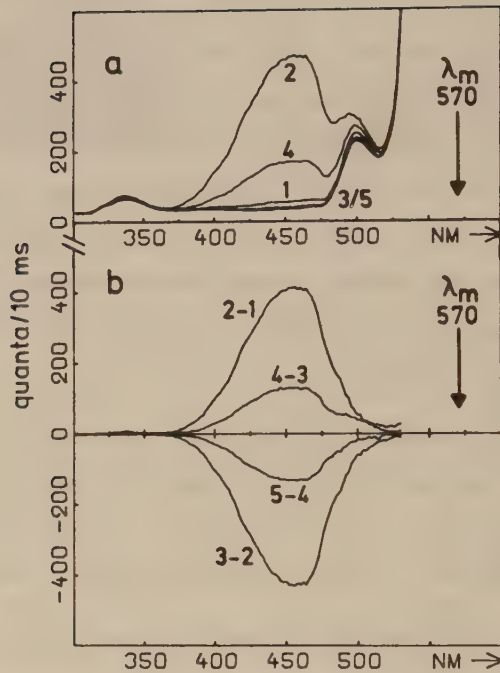


Abb.13

Anderung des Anregungsspektrums der Rhabdomere der Fliege nach UV-, Violett- und Blauadaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 570nm; Intensität der Adaptationslichter s. Tabelle 1; Objektiv 40x; Diät II). **Kurve 1:** Dunkeladaptierte Rhabdomere. **Kurve 2:** Nach 8 Minuten UV-Adaptation. **Kurve 3:** Nach anschließenden 8 Minuten Blauadaptation. **Kurve 4:** Nach 8 Minuten Violett-Adaptation mit UV-Blau-Mischlicht. **Kurve 5:** Nach nachfolgender Blauadaptation. Beachte die maximale Modulation nach UV-Adaptation gegenüber einer mittleren nach Violettadaptation. **b.** Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. Beachte die maximale Modulation bei 460nm nach UV- oder Violettadaptation und die vollständig reversible Wirkung der Blauadaptation. Die Modulationen zeigen die Bildung des Fluorophors  $B_R$ .

Nach achtminütiger UV-Adaptation wurde ein zweites Anregungsspektrum (Kurve 2) aufgenommen. Dieses Spektrum zeigte eine starke Fluoreszenzzunahme in der Region von 400 bis 480nm. Nach einer anschließenden achtminütigen Blauadaptation wurde ein drittes Anregungsspektrum (Kurve 3) aufgenommen, dessen Verlauf dem des Ausgangsspektrums nahezu glich. Die korrespondierenden Differenzspektren (Kurve 2 minus Kurve 1 und Kurve 3 minus Kurve 2) sind in Abbildung 13b gezeigt und beschreiben annähernd die Absorptionseigenschaften des im Blauen absorbierenden Fluorophors  $B_R$  mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 450nm. Weiterhin folgt aus diesen Differenzspektren, daß der blauabsorbierende Fluorophor  $B_R$  durch Blaustrahlung wieder bis auf seinen Ausgangswert abgebaut wird. In Verbindung mit den Ergebnissen der Kinetikmessungen (Abb.11 und 12) liegt der Schluß nahe, daß der Fluorophor  $B_R$  durch Blaubelichtung vollständig zum Fluorophor  $A_R$  regeneriert wird.

Um zu prüfen, ob sich bei gleichzeitiger Belichtung bei der Fluorophore die photochemische Reaktion von  $A_R$  nach  $B_R$  durch die Rückreaktion von  $B_R$  nach  $A_R$  kompensieren läßt, ob also eine photochemische Gleichgewichtsreaktion vorliegt, vergleichbar mit der des Rhodopsin - Metarhodopsinsystems der Invertebraten (Hamdorf 1979), wurden die Rhabdomere mit Violettstrahlung belichtet. Diese von beiden Fluorophoren absorbierte Violettstrahlung wurde mittels eines BG 12 Filters erzielt, dessen Transmissionsbereich im UV und im Blauen liegt (s. Abb.1). Die Kurven 4, 4 minus 3 und 5 minus 4 aus Abbildung 13 a und b zeigen, daß die Intensität der Fluoreszenz nach dieser breitbandigen Belichtung niedriger ist als nach einer reinen UV-Belichtung. Hieraus ist zu schließen, daß

tatsächlich ein photochemisches Gleichgewicht eingestellt wird, bei dem eine photochemische Umwandlung durch eine gleichzeitige photochemische Rückumwandlung kompensiert wird (Hamdorf, 1979). In gleicher Weise wurden die Absorptionseigenschaften des UV-absorbierenden Fluorophors  $A_R$  untersucht (Abb.14). Als Meßwellenlänge wurde hierbei  $\lambda_m = 437\text{nm}$  gewählt, eine Wellenlänge nahe des zu erwartenden Emissionsmaximums dieses Fluorophors. Bei denselben Rhabdomeren von Abb.13 wurden Anregungsspektren speziell in der UV-Region nach UV- und Blauadaptation aufgenommen (Abb.14a). Das hieraus gerechnete Anregungsdifferenzspektrum ist in Abbildung 14b gezeigt und beschreibt näherungsweise das Absorptionsspektrum des Fluorophors  $A_R$ . Maximale Absorption wurde bei etwa 380nm gefunden.

### 3.2.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

---

Wie aus den gezeigten Anregungsdifferenzspektren hervorgeht, überschneiden sich die Absorptionsspektren der Fluorophore  $A_R$  und  $B_R$  im UV-Bereich zwischen etwa 360 und 400nm (Abb.13 und 14). Für diesen Spektralbereich konnten durch Aufnahme von Emissionsspektren Informationen über die Absorptions- und Emissionseigenschaften der beiden Fluorophore gewonnen werden. Diese Emissionsspektren wurden bei Anregungswellenlängen von 360, 380 und 400nm aufgenommen.

Das bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_i = 380\text{nm}$  aufgenommene Emissionsspektrum ist in Abbildung 15, Kurve 1 gezeigt. Nach einer achtminütigen UV-Adaptation änderte sich das Emissionsspektrum signifikant (Kurve 2). Die Emission im blauen Spektralbereich nahm deutlich ab, während sie gleichzeitig im grün-gelben Bereich entsprechend anstieg. Bei 500nm blieb die

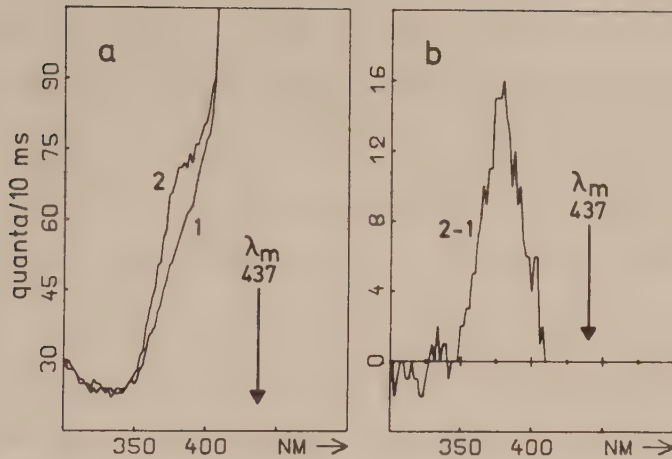


Abb.14

Änderung des Anregungsspektrums der Rhabdomere der Fliege nach Blau-Adaptation. a. Originalspektrn (Meßwellenlänge 437nm; Intensität des Adaptationslichts s. Tabelle 1; Objektiv 40x; Diät II). Kurve 1: Nach 8 Minuten UV-Adaptation. Kurve 2: Nach 8 Minuten Blauadaptation. b. Differenzspektrum gerechnet aus den Spektren von a. Beachte die maximale Modulation bei 380nm. Diese Modulation zeigt die Regeneration des Fluorophors  $A_R$ .

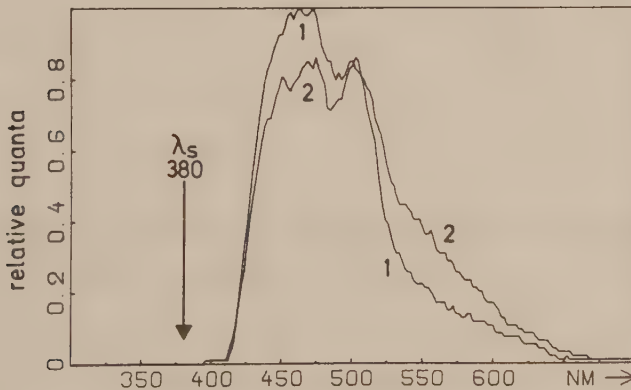


Abb.15

Änderung des Emissionsspektrums der Rhabdomere der Fliege nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 380nm; Intensität des Adaptationslichts s. Tabelle 1; Objektiv 40x; Diät II). Kurve 1: Dunkeladaptierte Rhabdomere. Kurve 2: Nach 8 Minuten UV-Adaptation. Beachte die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 460nm und ihre Zunahme bei 560nm.

Fluoreszenz konstant. Genauere Informationen ergeben sich aus dem Emissionsdifferenzspektrum (Abb.16,  $\lambda_0$  380). Der Verlauf mit einem Maximum bei 450nm, einem Isoemissionspunkt bei 500nm und einem Minimum bei 535nm zeigt, daß durch die Wellenlänge  $\lambda_0 = 380\text{nm}$  beide Fluorophore zur Fluoreszenz angeregt werden. Die fast gleich großen Amplituden von Minimum und Maximum weisen darauf hin, daß bei dieser Wellenlänge beide Fluorophore ( $A_R$ ,  $B_R$ ) nahezu gleich zur Fluoreszenz beitragen. Bei Anregung mit 400nm dagegen bewirken alternierende UV- und Blaubelichtungen nur geringe Modulation im blauen Spektralbereich, aber eine beträchtliche Emissionsänderung im grünen Spektralbereich mit einem Minimum bei 530nm (Abb.16, Kurve  $\lambda_0$  400). Im Gegensatz dazu bewirken alternierende UV- und Blaubelichtungen bei Anregung mit 360nm fast ausschließlich Änderungen im blauen Spektralbereich (Kurve  $\lambda_0$  360). Hier findet man ein Maximum bei 450nm und nur geringe Emissionsänderungen bei  $>520\text{nm}$ . Aus den Differenzspektren ist zu folgern, daß bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_0 = 400\text{nm}$  die Absorption des Fluorophors  $B_R$  wesentlich größer sein muß als die des Fluorophors  $A_R$ , dagegen bei 360nm umgekehrt die Absorption von  $A_R$  größer sein muß als die von  $B_R$ . Daher dürfte das bei Anregung mit  $\lambda_0$  360nm ermittelte Differenzspektrum mit guter Näherung dem des reinen Emissionsspektrums des Fluorophors  $A_R$  entsprechen und das bei Anregung mit  $\lambda_0 \geq 400\text{nm}$  ermittelte dem des reinen Emissionsspektrums des Fluorophors  $B_R$ .

Die Anregungs- und die damit korrespondierenden Emissionsspektren der Fluorophore  $A_R$  und  $B_R$  sind in Abbildung 17 gezeigt. Die gemessenen Rohspektren wurden korrigiert, geglättet und auf Eins normiert (s.Material und Methode 2.9.).

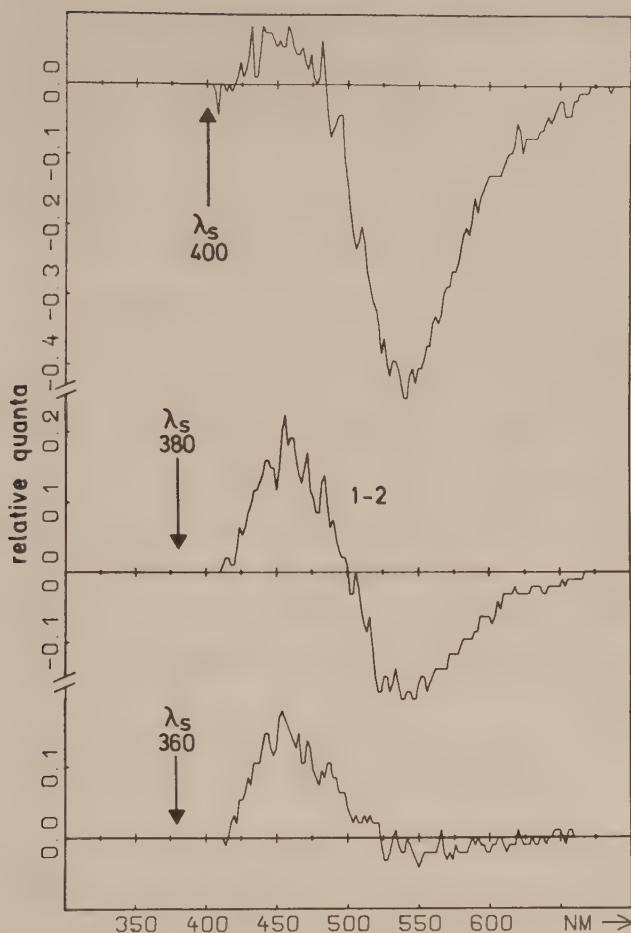


Abb.16

Abhängigkeit des Emissionsdifferenzspektrums von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 360, 380$  und  $400\text{nm}$ ). Alle Differenzspektren wurden von einem Rhabdomerpräparat nach UV-Adaptation (Spektrum der dunkeladaptierten Rhabdome minus Spektrum der UV-adaptierten Rhabdome) aufgenommen. (Die Emission der Originalspektren war bei den verschiedenen Anregungswellenlängen unterschiedlich hoch, so daß die in der Abbildung gezeigten Differenzspektren normiert wurden). Kurve  $\lambda_s 380$  ist die Differenz des in Abb.15 gezeigten Kurvenpaares. Anregung mit  $400\text{nm}$  bedingt größte Emissionsänderung bei  $540\text{nm}$ , Anregung mit  $380\text{nm}$  bedingt Abnahme der Emission bei  $450\text{nm}$  und vergleichbare Zunahme bei  $540\text{nm}$  und einem Isoemissionpunkt bei  $500\text{nm}$ . Anregung mit  $360\text{nm}$  verursacht nur eine Emissionsabnahme bei  $450\text{nm}$ . Spektrum  $\lambda_s 400\text{nm}$  gibt angenähert das invertierte Emissionsspektrum des Fluorophors  $B_F$ ,  $\lambda_s 360\text{nm}$  angenähert das Emissionsspektrum des Fluorophors  $A_F$  wieder.

Danach hat der Fluorophor  $A_R$  ein Absorptionsmaximum bei 360nm und ein Emissionsmaximum bei  $\sim 460$ nm. Das Absorptionsmaximum des Fluorophors  $B_R$  liegt bei  $\sim 440$ nm, sein Emissionsmaximum bei 550nm.

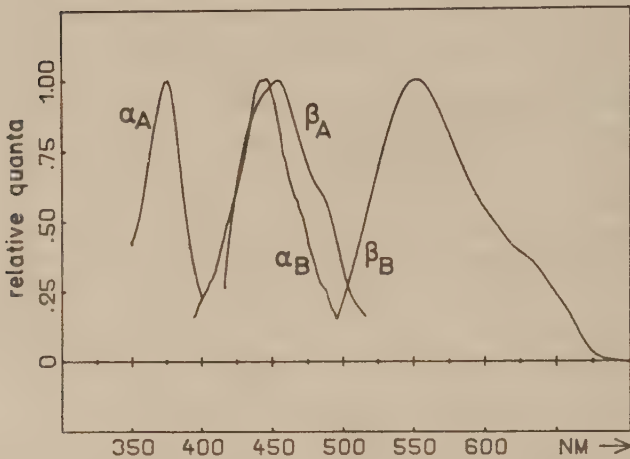


Abb.17

Korrigierte Anregungs- und Emissionsspektren des photoreversiblen Fluorophorsystems in den Rhabdomeren der Fliege. Die Spektren beruhen auf einem primären Farbstoff  $A_R$  mit maximaler Absorption bei 370nm und maximaler Emission bei 460nm und einem sekundären Farbstoff  $B_R$  mit maximaler Absorption bei 440nm und maximaler Emission bei 550nm. Die Spektren wurden aus den in den Abbildungen 13, 14 und 16 gezeigten Rohspektren gewonnen, auf Eins normiert und zur besseren Anschaulichkeit leicht geglättet.

### 3.2.4. Analyse der photochemischen Umwandlungsreaktionen

#### $A_R$ in $B_R$ und $B_R$ in $A_R$

Der diphasische Zeitverlauf der Emission während UV-Anregung läßt vermuten, daß beim Umwandlungsprozeß von  $A_R$  in  $B_R$  eine thermische Reaktion beteiligt ist. Aus den Anregungs- und Emissionsspektren geht hervor, daß bei UV-Anregung und Verwendung der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 520\text{nm}$  die Emission beider Fluorophore registriert wird, jedoch in unterschiedlichem Umfange. Während der Fluorophor  $A_R$ , bei einer hohen Absorptionswahrscheinlichkeit im UV, eine geringe Emissionswahrscheinlichkeit bei 520nm aufweist, verhält es sich beim Fluorophor  $B_R$  genau umgekehrt. Dieser besitzt eine geringere Absorptionswahrscheinlichkeit für UV-Strahlung, dafür aber eine höhere Emissionswahrscheinlichkeit bei 520nm. Daher ist während UV-Beleuchtung nur eine geringe Intensitätsänderung der Fluoreszenz bei  $\lambda_m = 520\text{nm}$  zu erwarten. Der diphasische Zeitverlauf der Fluoreszenz mit einem zunächst schnellen Abfall, Durchlaufen eines Minimums und anschließendem erneuten Anstieg (Abb.11a, Spur 2) weist darauf hin, daß die Absorption eines Photons durch den Fluorophor  $A_R$  zur Bildung eines nicht oder nur gering fluoreszierenden Zwischenprodukts Z führt, welches entweder direkt in einer nachgeschalteten Dunkelreaktion oder durch Absorption eines weiteren Lichtquants in den Fluorophor  $B_R$  übergeht. Die geringere Fluoreszenz dieses intermediären Photoprodukts im Vergleich zu der von  $A_R$  und  $B_R$  kann dabei entweder auf einer verringerten Absorptionswahrscheinlichkeit und/oder auf einer verringerten Emissionswahrscheinlichkeit beruhen. Aus dem in Abbildung 18a gezeigten Experiment (Versuchsbedingungen identisch mit denen von Abb.11) geht hervor,

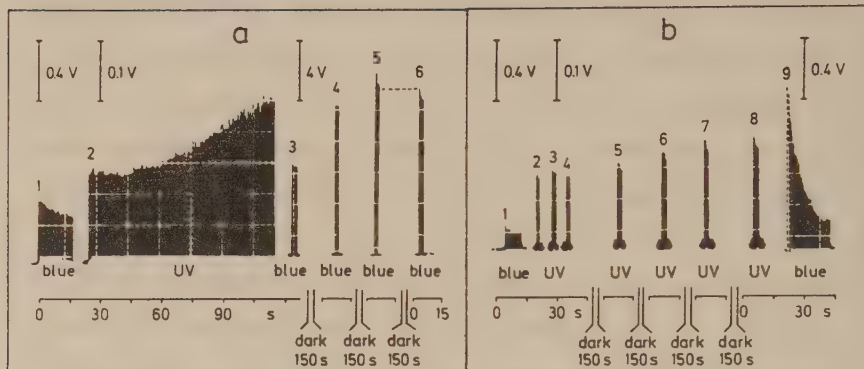


Abb.18

Kinetik der Fluoreszenz isolierter Rhabdomere der Fliege (Meßwellenlänge 520nm, Diät II). **a.** Einfluß von Dunkelperioden auf die Intensität der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation. Spur 1: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz dunkeladaptierter Rhabdomere nach UV-Adaptation. Spur 2: Zeitverlauf der Fluoreszenz während 90s UV-Anregung. Spur 3: Fluoreszenzintensität während 4 Sekunden Blauanregung unmittelbar nach Ende der UV-Anregung. Spuren 4, 5 und 6: Fluoreszenzintensitäten während 2 bis 3 Sekunden Blauanregung nach jeweils 150s Dunkelperiode. Beachte den Anstieg der initialen Fluoreszenzintensität mit zunehmender Länge der Dunkelperiode. Die etwas niedrigere Amplitude in Spur 6 (unterbrochene Linie) mag Folge einer beginnenden Photoumwandlung während des Stimulus in Spur 5 sein. **b.** Einfluß von Dunkelperioden auf die Amplituden der UV-angeregten Fluoreszenz. Spur 1: Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz dunkeladaptierter Rhabdomere. Spuren 2, 3, 4: Intensität der Fluoreszenz bei UV-Stimuli von 2 bis 4 Sekunden Dauer nach kurzen Dunkelperioden. Spuren 5, 6, 7 und 8: Intensität der Fluoreszenz bei UV-Stimuli von 2 bis 4 Sekunden nach Dunkelperioden von jeweils 150s. Beachte den Anstieg der Fluoreszenzintensität nach jeder Dunkelperiode. Spur 9: Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz nach der letzten UV-Anregung. Beachte hierbei den Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz infolge der UV-Stimulation.

daß beim UV induzierten Übergang von  $A_R$  in  $B_R$  tatsächlich eine relativ langsame Dunkelreaktion involviert ist: Bei diesem Experiment wurden dunkeladaptierte Rhabdomere nach kurzer Blauvorbelichtung (ca. 15s Abb. 18a, Spur 1) für 90s mit UV-Strahlung angeregt (Spur 2). Die Menge des während der UV-Belichtung gebildeten Fluorophors  $B_R$  wurde unmittelbar, nur wenige Sekunden nach Ende der UV-Belichtung mittels eines kurzen Blaustimulus registriert (Spur 3). Die blauangeregte Fluoreszenz und somit auch die Konzentration des Fluorophors  $B_R$  stieg im Dunkeln noch an und erreichte nach etwa 300s einen Maximalwert (s. Spuren 4 und 5). Der leichte Emissionsrückgang beim vierten Blaustimulus (Spur 6) läßt sich zwanglos auf eine partielle Umwandlung von  $B_R$  in  $A_R$  durch den dritten Blaustimulus zurückführen.

Zu einem in gleicher Weise interpretierbaren Ergebnis führte das Experiment von Abbildung 18b, bei dem die UV-Anregung durch Dunkelperioden unterbrochen wurde. Die Umwandlung von  $A_R$  in  $B_R$  setzte sich im Dunkeln fort, wie aus dem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach den Dunkelpausen (von Spur 5 bis Spur 8) hervorgeht. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß der diphasische Zeitverlauf der UV-angeregten Fluoreszenz (Abb. 11a, Spur 2) tatsächlich von zwei miteinander verknüpften Reaktionen herrührt, von einer photochemischen Reaktion gefolgt von einer thermischen Dunkelreaktion.

Um zu prüfen, ob bei der Rückumwandlung des Fluorophors  $B_R$  in den Fluorophor  $A_R$  ebenfalls eine Dunkelreaktion eingeschaltet ist, wurde das in Abbildung 19 gezeigte Experiment durchgeführt, bei dem die Versuchsbedingungen vergleichbar mit denen von Abbildung 11 waren. Nach einer 100s dauernden Rück-



Ob einer photochemischen Reaktion eine Ein- oder Mehrfachquantenreaktion zugrunde liegt, läßt sich an der Gültigkeit des  $I \cdot t$ -Gesetzes prüfen: Zur Klärung dieser Frage wurde das Experiment von Abb. 20 durchgeführt: Bei diesem wurde als Maß für die Zunahme an Photoprodukt der Intensitätsanstieg der blauangeregten Fluoreszenz nach 90s UV-Belichtung bestimmt. In der ersten Meßreihe wurde die Intensität der UV-Strahlung durch Graufilter variiert und in der zweiten Meßreihe bei konstanter UV-Intensität die Belichtungszeit. Bei Existenz einer Einquantenreaktion ist zu erwarten, daß durch gleiche Lichtmengen ( $I \cdot t$ ) bei beliebiger Variation von  $I$  bzw.  $t$  stets gleiche Mengen an Photoprodukt gebildet werden; nicht dagegen bei Zwei- oder Mehrquantenreaktionen, bei denen das zweite Quant innerhalb eines kurzlebigen Anregungszustands des Moleküls absorbiert werden muß; in diesem Fall wird bei niedriger Intensität überhaupt kein Photoprodukt entstehen können. Wie in Abbildung 20 gezeigt, unterschieden sich die Meßwerte für Zeitabhängigkeit und Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenz nur unwesentlich und lassen sich gut durch eine gemeinsame Ausgleichsfunktion  $y = 1 - e^{-kt}$  darstellen; ein klarer Beweis für die Gültigkeit des  $I \cdot t$ -Gesetzes.

Für die photochemische Rückreaktion von  $B_R$  in  $A_R$  konnte bisher mit der vorhandenen Meßapparatur kein derartig eindeutiges Experiment durchgeführt werden, da bei UV-Belichtung beide Fluorophore angeregt werden (s. Doppelkinetik). Nach konstanter UV-Adaptation folgt aber wohl auch die Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz weitgehend dem  $I \cdot t$ -Gesetz (Tabelle 1); denn das Verhältnis von initialer Amplitude zu Endamplitude ( $P_I / P_E$ ) blieb konstant bei Verdopplung bis Veracht-

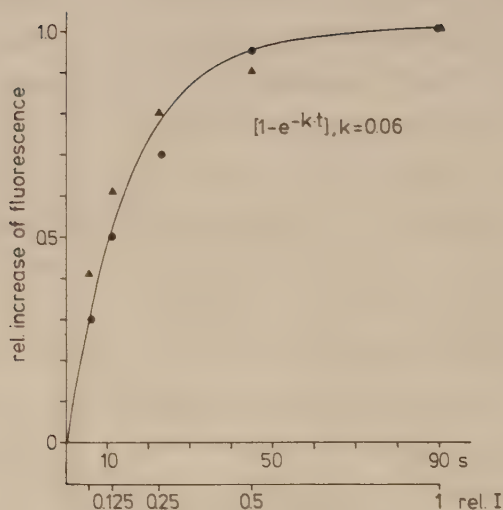


Abb.20

Anstiegsfunktionen der blauangeregten Fluoreszenz der Rhabdome der Fliege in Abhängigkeit von der Intensität bzw. von der Dauer der voraufgegangenen UV-Adaptation (Meßwellenlänge 520nm, Diät Herz). Dreiecke: Intensitätsabhängigkeit. Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz nach jeweils 90s UV-Adaptation und 3 Minuten Dunkelpause. Die Intensität der UV-Strahlung wurde mittels Graufilter (NG 5) variiert. Punkte: Zeitabhängigkeit. Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz nach 6 bis 90s UV-Adaptation mit rel. I = 1.0 nach 3 Minuten -kt Dunkelpause. Durchgezogene Linie: Ausgleichsfunktion  $y = 1 - e^{-kt}$  für  $k = 0.06$ . Die Abweichungen der Meßpunkte für Intensitäts- und Zeitabhängigkeit von der theoretischen Funktion sind geringfügig. Das I\*t-Gesetz dürfte daher gelten und somit der Umwandlung von  $A_R$  nach  $B_P$  eine Ein-Quantenreaktion zugrunde liegen.

fachung der Belichtungszeit und entsprechender Reduktion der Intensität.

| I     | t(s) | $P_I / P_E$ |       |
|-------|------|-------------|-------|
|       |      | a.)         | b.)   |
| I 1   | 30   | 1.896       | 2.125 |
| I 1/2 | 60   | 1.875       | 2.180 |
| I 1/4 | 120  | 1.895       | 2.375 |
| I 1/8 | 240  | 1.818       | 1.900 |

Tabelle 2

Intensitätsverhältnis der blauangeregten Fluoreszenz des Fliegenphotorezeptors (Diät Herz) zu Beginn und am Ende der Blauadaptation ( $P_I / P_E$ ) nach vorausgegangener konstanter UV-Adaptation. Bei Verdopplung bis Verachtfachung der Adaptationszeit (t) und gleichzeitiger Intensitätsschwächung (I) des blauen Adaptationslichtes bleibt das Verhältnis nahezu konstant, wie die beiden Versuche a.) und b.) zeigen. Daher scheint auch die Umwandlung des Fluorophors  $B_R$  über das Zwischenprodukt  $Z_2$  nach  $A_R$  dem  $I \cdot t$ -Gesetz zu folgen.

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Dunkelreaktion beim lichtinduzierten Übergang von  $A_R$  nach  $B_R$  wurden Anstiegsfunktionen der blauangeregten Fluoreszenz nach 90s UV-Vorbelichtung bei den Temperaturen  $15^\circ$ ,  $25^\circ$  und  $35^\circ$  C aufgenommen. Wie in Abbildung 21 gezeigt, waren Startpunkt, Anstieg und Endwert der Funktion bei  $15^\circ$  C wesentlich geringer als bei  $25^\circ$  C und  $35^\circ$  C. Die Zeitkonstanten ( $\tau = 1 - \frac{1}{Q}$ ) betrugen für  $15^\circ$  C  $\sim 150$ s und für  $25$  und  $35^\circ$  C  $\sim 90$ s. Für den Temperatursprung von  $15^\circ$  C auf  $25^\circ$  C ergibt sich hieraus ein  $Q_{10}$  von 1.7. Die Zeitverläufe des Fluoreszenzanstiegs lassen sich durch das Reaktionsmodell von Abb.6, wie in Abb.8 ausgeführt, recht gut approximieren, wenn die thermische Geschwindigkeitsvariable  $r_1$  kleiner  $r_2$  gewählt wird. Letztere Bedingung steht in Einklang mit den Befunden von Abb.11a: relativ langsame Umwand-

lung von  $A_R$  in  $B_R$  (diphasische Kinetik) gegenüber schnellerer Umwandlung von  $B_R$  in  $A_R$  während Blaubelichtung.

Der Effekt, daß bei dem Temperatursprung von  $25^{\circ}\text{C}$  auf  $35^{\circ}\text{C}$  sowohl Start- wie "Endamplitude" der Funktion annähernd konstant bleiben, läßt sich bereits dadurch erklären, daß die thermischen Geschwindigkeitsvariablen mit unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten wachsen, und zwar  $\tau_1$  langsamer als  $\tau_2$ .

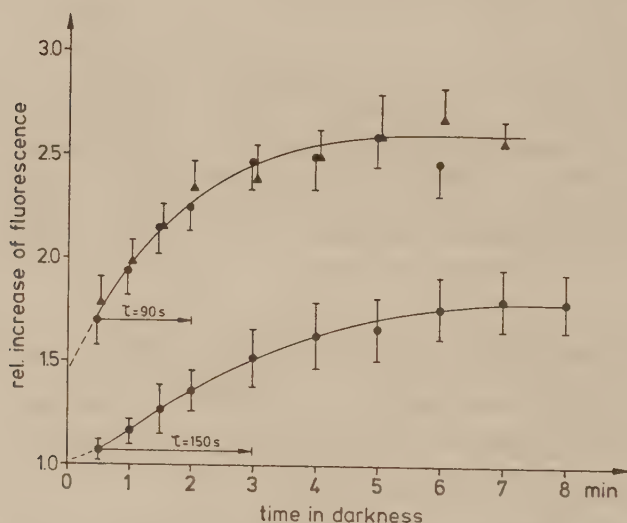


Abb. 21

Anstiegsfunktionen der blauangeregten Fluoreszenz der Rhabdome der Fliege nach 90s UV-Adaptation bei verschiedenen Temperaturen (Meßwellenlänge 520nm, Diät Herz). Obere Kurve: Anstiegsfunktionen für  $25^{\circ}\text{C}$  (Kreise) und  $35^{\circ}\text{C}$  (Dreiecke). Untere Kurve: Anstiegsfunktion für  $15^{\circ}\text{C}$ . Beachte den wesentlich flacheren Anstieg und die geringere Amplitude bei  $15^{\circ}\text{C}$ . Aus den Zeitkonstanten  $\tau = 1 - \frac{1}{Q_{10}}$  für den Temperatursprung von  $15^{\circ}\text{C}$  auf  $25^{\circ}\text{C}$  folgt ein  $Q_{10}$  von 1.7. Die Zeitverläufe des Fluoreszenzzuwachses nach Belichtung lassen sich durch die Modellrechnungen von Abb. 6 und 8 recht gut approximieren. Diese Übereinstimmung spricht für das Zutreffen des Reaktionsmodells von Abb. 6, bei dem aber  $\tau_1$  kleiner als  $\tau_2$  ist. Da bei dem Temperatursprung von  $25^{\circ}\text{C}$  auf  $35^{\circ}\text{C}$  sowohl Start- wie "Endamplituden" der Funktionen annähernd konstant bleiben, ist es möglich, daß die thermischen Geschwindigkeitsvariablen  $\tau_1(T^0)$  und  $\tau_2(T^0)$  mit verschiedenen Temperaturkoeffizienten anwachsen. Das beobachtete Ergebnis ist bei Zutreffen des Modells von Abb. 6 zu erwarten, wenn  $\tau_1$  langsamer anwächst als  $\tau_2$ .

### 3.2.5. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Rhodopsingehalt

Höchster Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz nach sättigender UV-Belichtung, nämlich um einen Faktor 30, wurde bei Rhabdomeren von extrem rhodopsinarmen Fliegen beobachtet, deren Maden auf der Vitamin-A-Mangeldiät II nach Zinkler angezogen wurden (s. Abb. 11). Mit steigendem Rhodopsingehalt, induziert durch Herz- und Leberdiät während der Larvalentwicklung, nahm dieses Fluoreszenzphänomen bis auf einen Faktor von etwa 2 ab (s. Tabelle 3). Diese umgekehrte Proportionalität zwischen Fluoreszenzaktivität und Rhodopsingehalt in Rhabdomeren legt zwei Deutungen nahe: Entweder werden die Fluorophore bei reduziertem Rhodopsingehalt verstärkt in die Mikrovilli eingelagert, oder ihre Konzentration bleibt konstant, aber ihre Fluoreszenz wird durch die enge Nachbarschaft zum Sehpigment gequenchet. Eins ist auf jeden Fall aufgrund der inversen Beziehung auszuschließen, nämlich daß die Fluorophore als chromophore Gruppe Retinal oder Retinol besitzen.

| Aufzuchtdiät         | Rhodopsingehalt (Prozent) | Anstiegsfaktor ( $\times \pm \sigma_{ij}$ ) | Anzahl d. Exp. (n) |
|----------------------|---------------------------|---------------------------------------------|--------------------|
| Leber                | 100                       | 1.9    0.5                                  | 15                 |
| Herz                 | 15                        | 5.6    1.4                                  | 12                 |
| Diät II <sup>a</sup> | 0.5                       | 29    7                                     | 17                 |

<sup>a</sup> = Nach Zinkler 1982

Tabelle 3

Einfluß der Aufzuchtdiät auf den Rhodopsingehalt der Fliegenphotorezeptoren und den Anstiegsfaktor der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation. Beachte: Größte Zunahme der Fluoreszenz wird bei dem niedrigsten Rhodopsingehalt in den Rhabdomeren (Diät II) induziert.

### 3.2.6. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom extrazellulären

#### pH-Wert

Die UV-induzierte Zunahme des Blauabsorbers  $B_R$  wurde an Rhabdomeren von auf Herzfleisch angezogenen Fliegen (Anstiegsfaktor 5.6; Tabelle 3) durch Aufnahme von Anregungsspektren ( $\lambda_m = 568\text{nm}$ ) in Abhängigkeit vom pH bestimmt (Abb.22). Hierzu wurden die Rhabdomere jeweils eines Auges auf sechs verschiedene 0.05 M Phosphatpufferlösungen mit sechs verschiedenen pH-Werten aufgeteilt. Das Verhältnis von Natrium- zu Kaliumionen wurde bei allen Proben unabhängig vom pH-Wert konstant gehalten. Die Anregungsspektren wurden vor und nach UV-Adaptation aufgenommen und die jeweiligen Amplituden der Differenzspektren auf die Amplitude bei pH 5.7 normiert. Mit sinkendem pH nahm die relative Amplitudenmodulation zu, d.h. die photochemische Umwandlungsrate des Fluorophors  $A_R$  in den Fluorophor  $B_R$  stieg mit sinkendem pH (Abb.22). Die empirisch gewonnenen Daten sind sehr gut durch eine theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten von 2 und einem pK-Wert von 6.3 zu approximieren. Dies impliziert, daß mindestens zwei Protonen zur Bildung des Fluorophors  $B_R$  notwendig sind.

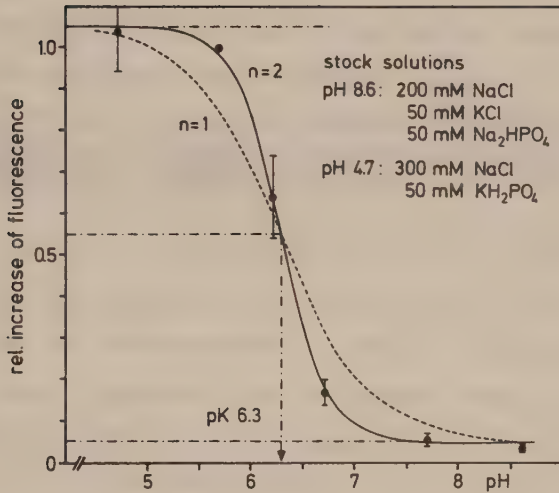


Abb.22

pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzmodulation des Fluorophors  $B_R$  der Fliegenrhabdomere nach UV-Adaptation (Meßwellenlänge 568 nm; bei Einstellung aller pH-Werte wurde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  konstant gehalten; Diät Herz). Die Datenpunkte geben den Fluoreszenzanstieg dunkeladaptierter Rhabdomere nach 8 Minuten UV-Adaptation an. Jeder Datenpunkt nebst Standardabweichung ist das Mittel sechs verschiedener Serien an jeweils einem Auge. Jede Serie wurde für sich auf die Modulation bei pH 5.7 normiert. Unterbrochene Linie: Theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten  $n=1$  bei einem  $\text{pK}=6.3$ . Durchgezogene Linie: Theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten  $n=2$ , welche die experimentell gefundenen Daten sehr gut beschreibt.

### 3.3. Das Fluorophorsystem in den Semperzellen der Fliege

Ein ähnliches System wie in den Rhabdomeren wurde in den Semperzellen gefunden. Allerdings sind die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten weitaus geringer, so daß es schwieriger war, dieses Fluorophorsystem gleich gut zu charakterisieren.

#### 3.3.1. Photokinetik der Fluorophore

Ähnlich wie bei den Rhabdomeren wurde auch bei dunkeladaptierten Semperzellen bei blauem Anregungslicht und der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 520\text{nm}$  eine grünliche Fluoreszenz registriert. Der Zeitverlauf dieser Fluoreszenz war bei den untersuchten Mutanten von *Calliphora* recht ähnlich, der der Wildform unterschied sich davon jedoch erheblich.

Bei der Mutante "Chalky" nahm die Intensität der Fluoreszenz bei 30s Blauanregung auf etwa die Hälfte ab (Abb.23, Spur 1). Nach 150s Dunkelpause wurde der Zeitverlauf der Fluoreszenz bei einer zweiten Blauanregung registriert (Spur 2). Die Intensität der Fluoreszenz überstieg zu Beginn dieser Anregung geringfügig den Endwert der vorangegangenen. Daher kann im Dunkeln nur eine geringe Regeneration stattgefunden haben. Während zweier nachfolgender UV-Anregungen, die von 150s Dunkelheit unterbrochen wurden, nahm die Fluoreszenz geringfügig ab (Spuren 3 und 4). Bei der nachfolgenden Blauanregung überstieg die initiale Intensität der Fluoreszenz den Wert von zu Versuchsbeginn um etwa den Faktor 2 (Spur 5). Die Intensitätszunahme der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Bestrahlung ist somit niedriger als in den Rhabdomeren. Nach 150s Dunkelpause überstieg die initiale Fluoreszenz erneut deutlich den Endwert der vorausgegangenen (Spur 6). Hieraus bieten sich

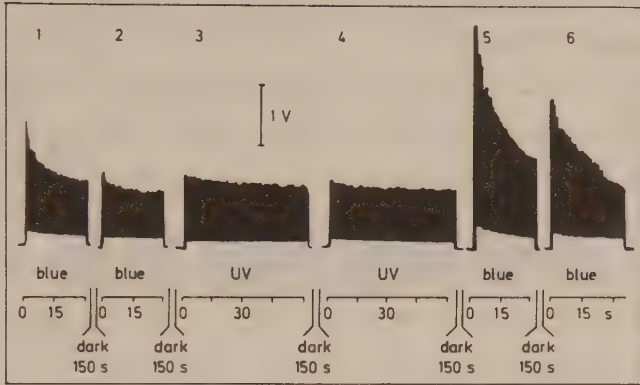


Abb.23

Kinetik der Fluoreszenz der Semperzellen der Fliege bei Blau- und UV-Belichtung (Mutante "Chalky"; Diät Herz; Meßwellenlänge 520nm). Spur 1: Abnahme der Fluoreszenz dunkeladaptierter Semperzellen während Blauanregung. Spur 2: Weitere Abnahme der Fluoreszenz nach 150s Dunkelheit. Spur 3: Schwache Abnahme der Fluoreszenz während UV-Anregung nach 150s Dunkelheit. Spur 4: Annähernd konstante Fluoreszenzkinetik während UV-Anregung nach weiteren 150s Dunkelheit. Spur 5: Abnahme der Fluoreszenz während Blauanregung nach 150s Dunkelheit. Spur 6: Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz nach 150s Dunkelheit. Beachte die erneute Zunahme der Fluoreszenzintensität in Spur 6. Beachte ebenfalls die Verdopplung der Fluoreszenzintensität in Spur 5 gegenüber Spur 1. Diese Ergebnisse deuten auf ein ähnliches System hin wie in den Rhabdomeren.

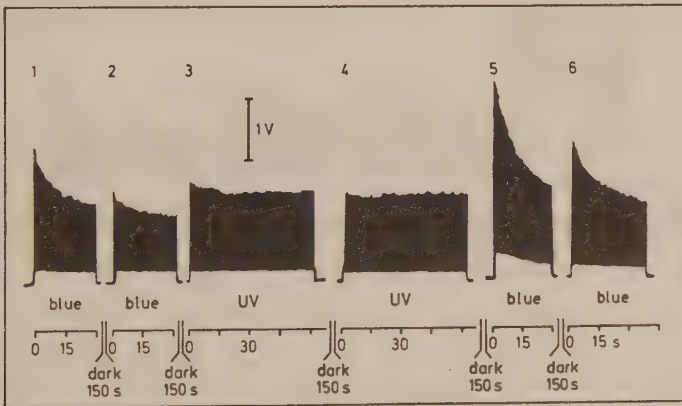


Abb.24

Kinetik der Fluoreszenz der Semperzellen der Fliege. Fortsetzung des Experiments aus Abb.23. Beachte die gute Reproduzierbarkeit (s. Abb.23).

unter Annahme des Reaktionsmodells von Abb.6 zwei Interpretationsmöglichkeiten an:

1. Die thermische Reaktionsvariable  $r_1$  ist so langsam, daß -- während der Dunkelperiode von 150s nach UV-Belichtung nur ein Teil von  $Z_1$  in  $B_3$  übergegangen ist und somit durch die erste Blaubelichtung nur diese  $B_3$ -Fraktion in  $Z_2$  photoaktiviert werden kann. Während der zweiten Dunkelperiode wird sich aus  $Z_1$  erneut  $B_3$  anhäufen können und somit auch bei der zweiten Blaubelichtung wieder zu einer höheren Initialamplitude führen.
2. Die Dunkelperiode von 150s ist ausreichend, um alles  $Z_1$  in --  $B_3$  zu überführen. Bei Blaubelichtung kann somit alles  $B_3$  in  $Z_2$  photoaktiviert werden. Wenn bei der zweiten Blaubelichtung trotzdem eine höhere Initialamplitude auftritt, ist anzunehmen, daß  $Z_2$  nur partiell in  $A_3$  übergeht und ein anderer Anteil nach  $B_3$  zurückfällt. Damit würde die zweite Blaubelichtung auf die von  $Z_2$  zurückgefallene  $B_3$ -Fraktion treffen.

Weitere alternierende Blau- und UV-Belichtungen demonstrieren die gute Reproduzierbarkeit dieses Versuchs (Abb.24). Mehrfach alternierende Belichtungen führten zu einem allmählichen Ausbleichen des Systems.

Inwieweit die Fluorophore mit anderen Pigmentstrukturen gekoppelt sind, läßt sich durch Kinetikmessungen an den Spermazellen der verschiedenen Mutanten und des Wildtyps prüfen (Abb.25, 26, 27; Versuchsbedingungen wie in Abb.23). Hier wurden unterschiedliche Reaktionen auf die Sequenzen der Blau- und UV-Belichtungen gefunden. Hervorzuheben sind folgende Effekte:

1. "Lemon": Eine nur schwache Steigerung der blauangeregten -----  
Fluoreszenz nach UV-Adaptation (Abb.25).

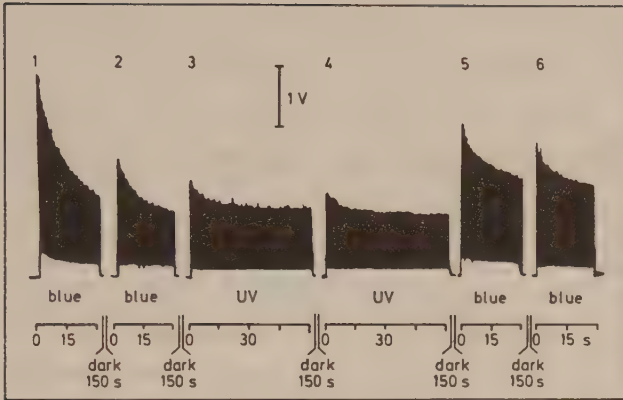


Abb. 25

Kinetik der Fluoreszenz der Semperzellen der Fliege; Mutante "Lemon" (Diät Herz; Versuchsbedingungen wie in Abb. 23). Beachte die Ähnlichkeit der Kinetik mit der von "Chalky" (Abb. 23), aber auch die nur schwache Steigerung der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation (Spuren 5 und 6).

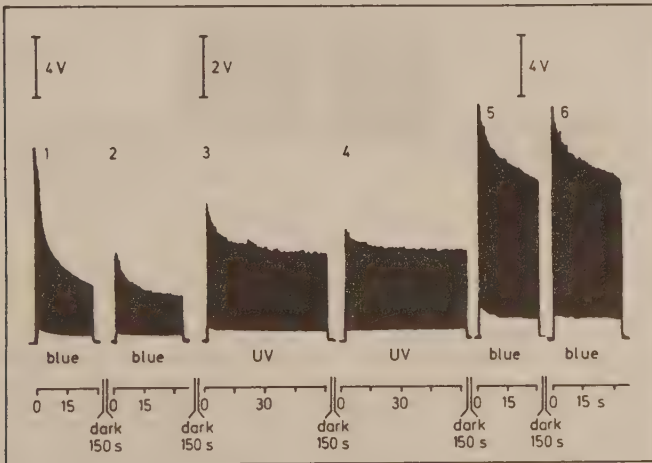


Abb. 26

Kinetik der Fluoreszenz der Semperzellen der Fliege; Mutante "White Apricot" (Diät Herz; Versuchsbedingungen wie in Abb. 23). Beachte die rapide Abnahme der blauangeregten Fluoreszenz bei der primären Blaubelichtung gegenüber der wesentlich geringeren nach UV-Belichtung. Dieser Befund spricht für eine Modulation der Quantenausbeute beim Durchlaufen des Zyklus.

2. "White Apricot": Eine große Initialamplitude und eine rapide Abnahme der primären blauangeregten Fluoreszenz. Eine wesentlich langsamere Fluoreszenzabnahme letzterer nach UV-Adaptation. Unter Annahme des Modells von Abb.6 spricht dies für eine Erhöhung der Absorption und/oder der Quantenausbeute bei Durchlaufen des Zyklus (Abb.26).

3. Wildtyp: Eine vollkommen abweichende Kinetik mit einerseits rapider Fluoreszenzabnahme zu Beginn jeder Blauanregung und andererseits direktem Intensitätsanstieg bei UV-Anregung. Es gibt keinen Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation (Abb.27).

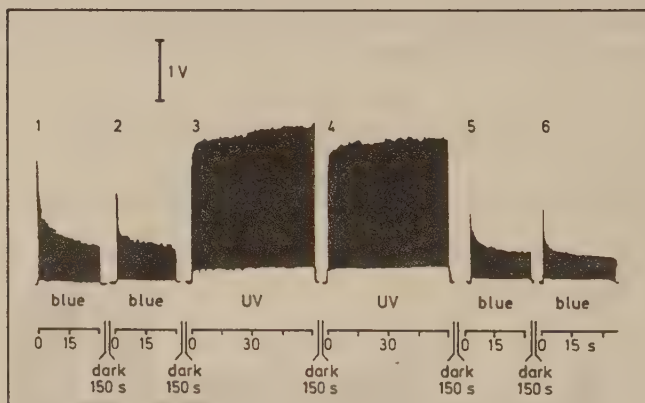


Abb.27

Kinetik der Fluoreszenz der Semperzellen der Fliege; Wildtyp (Diät Herz; Versuchsbedingungen wie in Abb.23). Beachte einerseits die rapide Abnahme zu Beginn jeder Blauanregung und andererseits den direkten Anstieg der Fluoreszenzintensität bei UV-Anregung. Beachte, daß UV-Adaptation keine Steigerung der blauangeregten Fluoreszenz bedingt (vergl. Spur 5 mit 2).

Diese Befunde sprechen für eine Kopplung der Fluorophore an das Schirmpigmentsystem. Zumindest beim Wildtyp wird das Fluorophorsystem durch Interaktion mit dem Schirmpigmentsystem moduliert. Wie ist noch fraglich. Neben einer direkten Interaktion ist auch eine Modulationen durch Absorption von Anregungslicht und durch Quenchung der Emission durch die Schirmpigmente denkbar. Um diese Effekte zu analysieren, sind noch umfangreiche Experimentalreihen notwendig.

### 3.3.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

Anregungsspektren wurden nach alternierenden UV - und Blaubeleuchtungen mit der bei den Rhabdomeren verwendeten experimentellen Methode aufgenommen (Abb.28a) und die korrespondierenden Anregungsdifferenzspektren berechnet. Die bei der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 568\text{nm}$  ermittelten Differenzspektren (Abb.28b) geben näherungsweise das Absorptionsspektrum des Fluorophors  $B_g$ , die bei der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 437\text{nm}$  ermittelten (Abb.29b) näherungsweise das Absorptionsspektrum des Fluorophors  $A_g$  an. Die Anregungsmaxima bei 375nm für  $A_g$  und 450nm für  $B_g$  unterscheiden sich nur geringfügig von denen der Fluorophore in den Rhabdomeren.

### 3.3.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

Emissionsspektren der Semperzellen wurden jeweils vor und nach einer UV - Belichtung aufgenommen. Abbildung 30 zeigt Emissionsspektren dunkeladaptierter Semperzellen (Kurve 1) und nach vier Minuten UV-Adaptation (Anregungswellenlänge  $\lambda_i = 380\text{nm}$ ). Bei dieser Anregungswellenlänge bewirkt UV-Adaptation eine deutliche Emissionsabnahme bei 460nm. Emissionsspektren wurden bei den Anregungswellenlängen 360, 380, 400 und 415nm

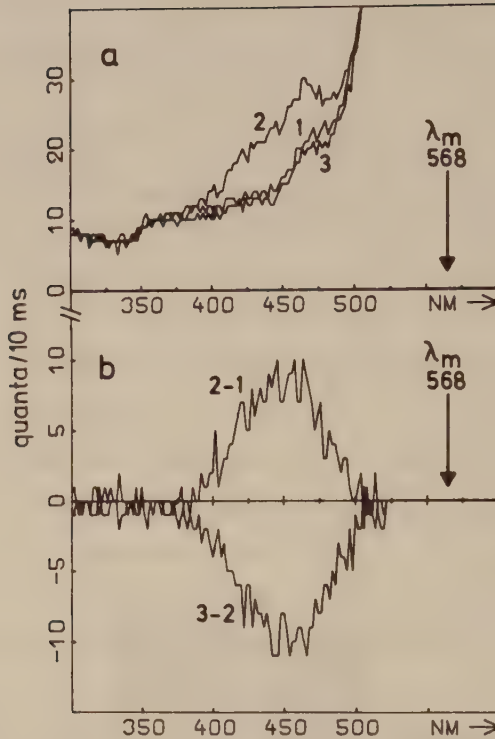


Abb.28

Änderung der Anregungsspektren der Semperzellen nach Blau- bzw. UV-Adaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 568 nm; Diät Herz). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 8 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließend 4 Minuten Blauadaptation. **b.** Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. Beachte die maximale Modulation bei 450nm nach UV-Adaptation (Kurve 2-1) und die vollständige Reversibilität bei Blauadaptation (Kurve 3-2). Die Modulationen zeigen die Bildung des Fluorophors  $B_3$  und seine Rückführung in  $A_3$ .

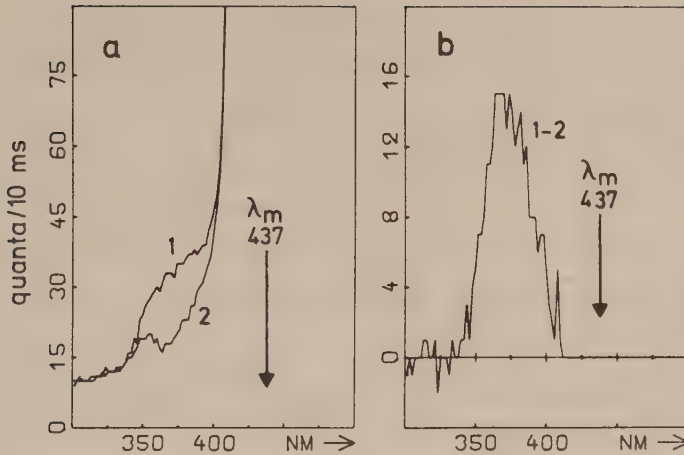


Abb. 29

Änderung des Anregungsspektrums der Semperzellen nach UV-Adaptation. a. Originalspektren (Meßwellenlänge 437nm; Diät Herz). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 8 Minuten UV-Adaptation. b. Differenzspektrum, gerechnet aus den Spektren von a. Beachte die durch UV induzierte maximale Modulation bei 375nm. Die Modulation zeigt den Abbau des Fluorophors  $A_S$ , der sehr ähnliche Eigenschaften wie der Fluorophor  $A_R$  der Rhabdomere aufweist.

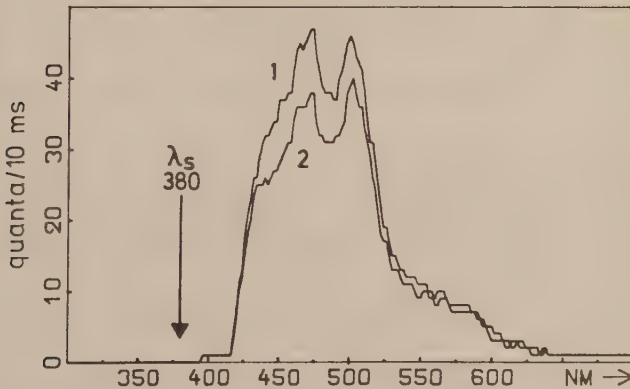


Abb. 30

Änderung des Emissionsspektrums der Semperzellen nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 380nm; Diät Herz). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 8 Minuten UV-Adaptation. Beachte die Emissionsabnahme bei 460nm.

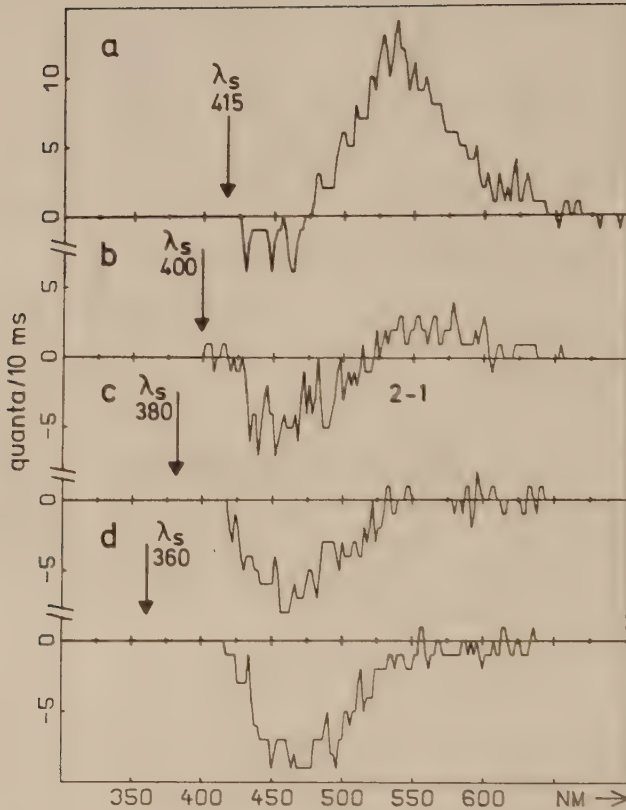


Abb.31

Abhängigkeit des Emissionsdifferenzspektrums der Semperzellen von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 360, 380, 400$  und  $415$  nm). Alle vier Differenzspektren wurden von den Semperzellen eines Präparats nach UV-Adaptation (UV-adaptiert minus dunkeladaptiert) gewonnen. Kurve  $\lambda_s 380$  ist die Differenz des in Abb.30 gezeigten Kurvenpaares. Anregung mit  $415$  nm führt zu einer maximalen Modulation bei  $540$  nm. Anregung mit  $400$  nm bedingt eine Emissionsabnahme bei  $460$  nm, eine leichte Zunahme bei  $550$  nm und einen Isoemissionspunkt bei  $\sim 510$  nm. Anregung mit  $360$  bzw.  $380$  nm führt ausschließlich zur Emissionsabnahme bei  $\sim 460$  nm. Spektrum  $\lambda_s 415$  gibt annähernd das Emissionsspektrum des Fluorophors  $B_s$ , Spektrum  $\lambda_s 360$  annähernd das invertierte Emissionsspektrum des Fluorophors  $A_s$  wieder. Beachte die Lage des Isoemissionspunkts bei Anregung mit  $\lambda_s = 400$  nm.

aufgenommen. Die korrespondierenden Differenzspektren (Abb. 31) zeigen, daß die Absorptionsmaxima der beiden Fluorophore  $A_S$  und  $B_S$  in einem Spektralbereich liegen, der etwas längerwellig gegenüber dem der Fluorophore  $A_R$  und  $B_R$  der Rhabdomere verschoben ist. Während bei den Rhabdomeren beide Fluorophore durch 380nm annähernd gleich angeregt werden, liegt diese Wellenlänge für die Semperzellen zwischen 400 und 415nm nahe 400nm (Abb.31). Die Anregungswellenlängen für die jeweils annähernd reinen Emissionsspektren der Fluorophore  $A_S$  und  $B_S$  sind gegenüber denen der Fluorophore  $A_R$  und  $B_R$  der Rhabdomere um etwa 15nm längerwellig verschoben. Für  $A_S$  liegt diese Wellenlänge bei 380nm, für  $B_S$  etwas oberhalb 415nm. Die korrigierten Anregungs- und ihre korrespondierenden Emissionsspektren für  $A_S$  und  $B_S$  sind in Abbildung 32 gezeigt und wurden aus den in den Abbildungen 28, 29 und 31 gezeigten Rohspektren gewonnen.

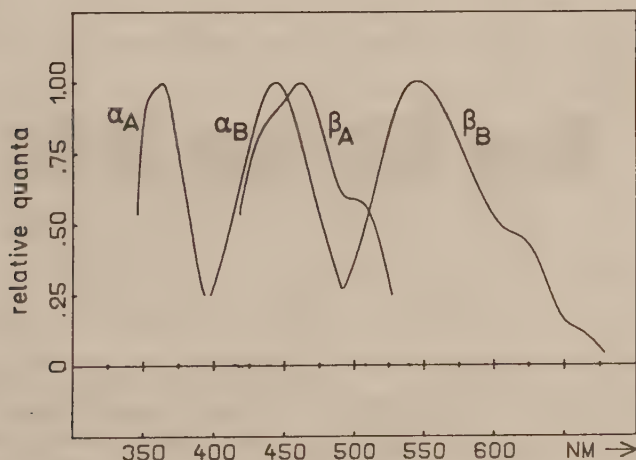


Abb.32

Korrigierte Anregungs- und Emissionsspektren des photoreversiblen Fluorophorsystems der Semperzellen der Fliege. Die Spektren beruhen auf einem primären Farbstoff  $A_S$  maximaler Absorption bei 370nm und maximaler Emission bei 470nm und einem sekundären Farbstoff  $B_S$  maximaler Absorption bei 450nm und maximaler Emission bei 540nm. Alle Spektren wurden aus den in den Abbildungen 28, 29 und 31 gezeigten Rohspektren gewonnen, auf Eins normiert und zur besseren Anschaulichkeit leicht geglättet.

### 3.4. Das Fluorophorsystem in der Cornea der Fliege

Ein weiteres Fluorophorsystem wurde in der Cornea der Fliege gefunden, welches sich allerdings von denen der Rhabdomere und Semperzellen zu unterscheiden scheint.

#### 3.4.1. Photokinetik der Fluorophore

Die Photokinetik der isolierten Cornea (Abb.33) ähnelt der der Semperzellen der Mutante "Lemon" (vergl. Abb.25). Allerdings war die Initialamplitude der primären blauangeregten Fluoreszenz wesentlich niedriger (Spur 1). Nach 150s Dunkelpause überstieg die initiale Fluoreszenz einer erneuten Blauanregung nur geringfügig den Endwert der vorangegangenen (Spur 2). Nach UV-Adaptation (Spuren 3 und 4) erreichte die Initialamplitude der blauangeregten Fluoreszenz (Spur 5) annähernd den Wert der

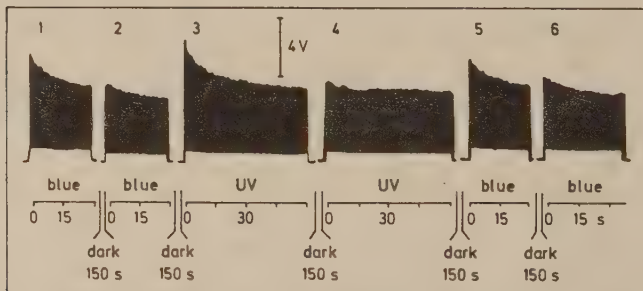


Abb.33

Kinetik der Fluoreszenz der isolierten Cornea der Fliege während Blau- und UV-Anregung (Meßwellenlänge 520nm; Diät Herz). Spur 1: Abnahme der Fluoreszenz der dunkeladaptierten Cornea während Blauanregung. Spur 2: Weitere Fluoreszenzabnahme nach 150s Dunkelpause. Spur 3: Abnahme der Fluoreszenz während UV-Anregung nach 150s Dunkelheit. Spur 4: 150s Dunkelheit hat keinen Einfluß auf die Kinetik während UV-Anregung. Spur 5: Abnahme der blauangeregten Fluoreszenz nach 150s Dunkelperiode. Spur 6: Fluoreszenz nach 150s Dunkelpause. Beachte den nur geringen Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation. Beachte weiterhin die Ähnlichkeit mit der Kinetik der Semperzellen der Mutante "Lemon" (s. Abb.25).

ersten Blaubelichtung (von Spur 1). Es ist aus diesem Experiment nicht zu entscheiden, ob dieser Anstieg auf UV-Adaptation oder auf eine Regeneration im Dunkeln zurückzuführen ist.

#### 3.4.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

---

Die Absorptionsspektren der cornealen Fluorophore unterscheiden sich deutlich von denen der Fluorophore in Photorezeptoren und Semperzellen. Anregungsspektren wurden von unbelichteten Corneae und nach UV- und Blaubelichtung aufgenommen und die korrespondierenden Differenzspektren berechnet. Das Anregungsspektrum der dunkeladaptierten Cornea zeigte ein Maximum bei 380nm (Abb.34a, Kurve 1;  $\lambda_m = 568\text{nm}$ ). UV-Adaptation bewirkte eine Fluoreszenzabnahme um 380nm und eine Zunahme um 460nm, Blauadaptation hingegen ausschließlich Abnahme der Fluoreszenz (Maximum bei 450nm) über den Spektralbereich von 380 bis 500nm (Abb.34b Kurven 1-2 und 2-3). Die bei  $\lambda_m = 450\text{nm}$  aufgenommenen Anregungs- und Anregungsdifferenzspektren (Abb. 35a,b) zeigten nach UV-Adaptation maximale Reduktion der UV-Absorptionsbande um 380nm.

#### 3.4.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

---

UV-Belichtung bewirkte eine Emissionsabnahme um 460nm (Abb.36,  $\lambda_e = 390\text{nm}$ ). Wie aus den Differenzspektren zu ersehen (Abb. 37), verursachte UV-Adaptation bei Anregung mit 360, 390 und 400nm eine Emissionsabnahme um 460nm. Blauadaptation bewirkte bei 390 und 400nm einen weiteren Rückgang der Emission (Maximum um 510nm). Diese Emissionsbande dürfte mit der um 460nm beobachteten Anregungsbande korrespondieren. Ob die bei Anregung mit 360nm beobachtete geringe Emissionszunahme relevant ist,

läßt sich aus diesem Versuch nur schwer entscheiden, wird aber durch die Befunde an der Cornea von Deilephila gestützt (Abb.56).

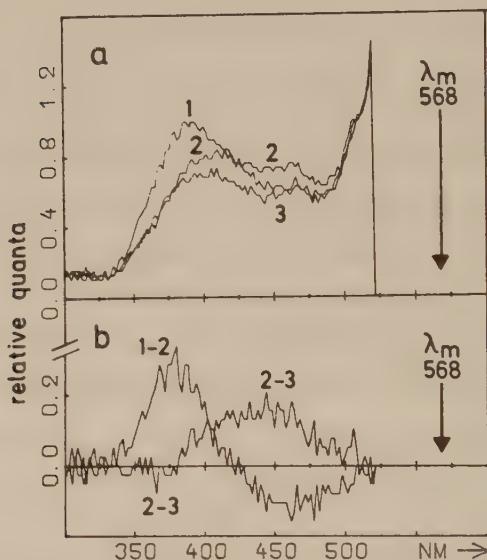


Abb.34

Änderung des Anregungsspektrums der isolierten Cornea der Fliege nach UV- und Blauadaptation. a. Originalspektren (Meßwellenlänge 568nm; Diät Herz). Kurve 1: Dunkeladaptierte Cornea. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließenden 4 Minuten Blauadaptation. b. Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Kurven. Kurve 1-2: Maximale Modulation bei 380nm und geringere Modulation bei 460nm. Kurve 2-3: Maximale Absorption bei 450nm. Die Modulationen zeigen näherungsweise den Abbau des primären Fluorophors  $A_c$  und den Aufbau des Folgefluorophors  $B_c$  (1-2) sowie den Abbau von  $B_c$  (2-3).

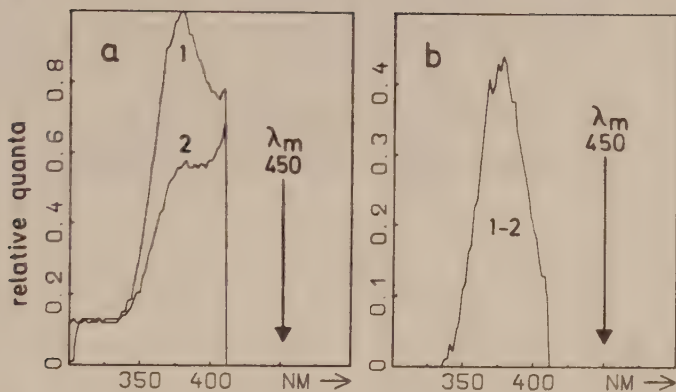


Abb. 35

Änderung des Anregungsspektrums der Cornea der Fliege nach UV-Adaptation. a. Originalspektren (Meßwellenlänge 450nm; Diät Herz). Kurve 1: Dunkeladaptierte Cornea. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. b. Differenzspektren aus den in a. gezeigten Spektren. Die Modulation bei 380nm zeigt die Umwandlung des Fluorophors  $A_F$ .

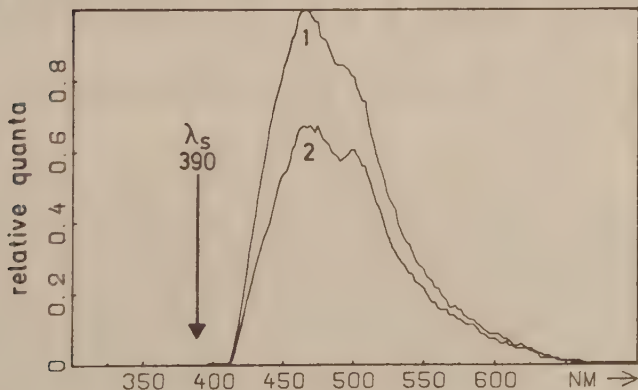


Abb. 36

Änderung des Emissionsspektrums der Cornea der Fliege nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 390nm; Diät Herz). Kurve 1: Dunkeladaptierte Cornea. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Beachte die Emissionsabnahme um 460nm.

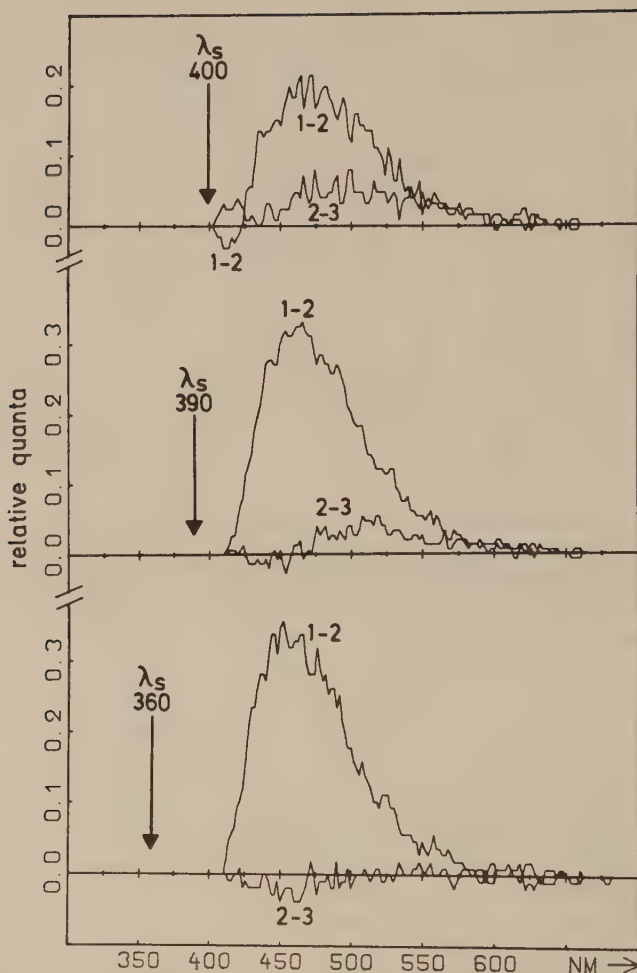


Abb.37

Abhängigkeit des Emissionsdifferenzspektrums der Cornea von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 360, 390$  und  $400\text{nm}$ ). Alle Differenzspektren wurden nach alternierenden UV- und Blauadaptation von einer Cornea (Diät Herz) aufgenommen (1-2 = dunkel-adaptiert minus uv-adaptiert; 2-3 = uv-adaptiert minus blau-adaptiert). Alle Differenzspektren zeigen nach UV-Adaptation eine Emissionsabnahme um  $460\text{nm}$ . Dies deutet auf eine Überlappung der Fluorophore  $A_C$  und  $B_C$ . Bei Anregung mit  $390$  und  $400\text{nm}$  führt Blauadaptation ebenfalls zur Emissionsreduktion (Maximum um  $510\text{nm}$ ). Diese Emissionsbande dürfte mit der um  $460\text{nm}$  beobachteten Anregungsbande (s. Abb.34) korrespondieren. Blauadaptation führt bei  $360\text{nm}$  zu einer geringen Zunahme der Emission (Kurve 2-3).  $\lambda_s 360\text{nm}$ , Kurve 1-2 zeigt annähernd das Emissionsspektrum des Fluorophors  $A_C$ .

### 3.5. Das Fluorophorsystem in den Rhabdomeren von *Deilephila*

Ein ähnliches System wie in den Rhabdomeren von *Calliphora* liegt auch in den Rhabdomeren von *Deilephila* vor. Es ist allerdings schwerer zu analysieren, da hier einerseits die Fluoreszenz der Rhabdomere geringer ist und andererseits durch die Autofluoreszenz der die Rhabdomere umgebenden Tracheolen überdeckt wird.

#### 3.5.1. Photokinetik der Fluorophore

Wie in Abb.38 Spur 1 gezeigt, regte Blaustrahlung eine schwache Fluoreszenz an, deren Intensität ähnlich wie bei den Rhabdomeren der Fliege mit der Zeit abnimmt. Bei UV-Anregung wur-

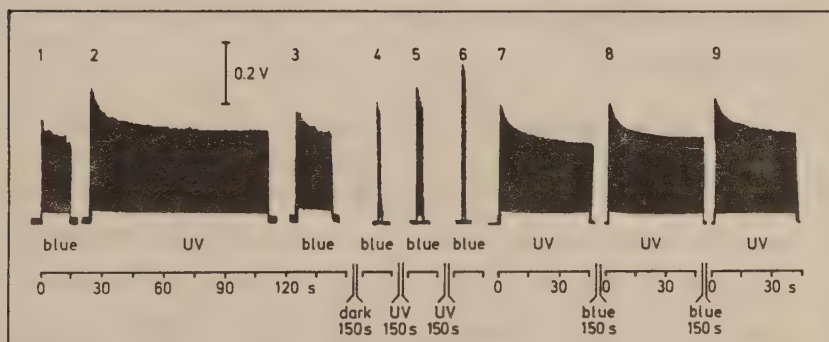


Abb.38

Kinetik der Fluoreszenz der Photorezeptoren von *Deilephila* bei Blau- und UV-Anregung (Meßwellenlänge 520nm). Spur 1: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz während Blauanregung. Spur 2: Kinetik der Fluoreszenz während UV-Anregung. Spur 3: Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz unmittelbar nach Ende der UV-Anregung. Spuren 4 bis 6: Fluoreszenz während 2 bis 3 Sekunden Blauanregung nach jeweils 150s Dunkelheit. Beachte den Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz über die Zeit. Spur 7: Kinetik der UV-angeregten Fluoreszenz unmittelbar nach Ende der letzten Blauanregung. Spuren 8 und 9: Kinetik der UV-angeregten Fluoreszenz nach jeweils 150s Blauanregung. Beachte hierbei die jeweils vollständige Regeneration der UV-angeregten Fluoreszenz. Dieses Experiment spricht dafür, daß wie bei den Fliegenrhabdomeren sowohl bei der Rückreaktion ( $B_{DR}$  in  $A_{DR}$ ) als auch bei der Hinreaktion ( $A_{DR}$  in  $B_{DR}$ ) eine photochemische gefolgt von einer thermischen Dunkelreaktion existiert.

de nach etwa 45s ein konstanter Endwert erreicht (Spur 2). Der Initialwert der daran anschließenden mit Blau angeregten Fluoreszenz überstieg den Initialwert der ersten Blaubelichtung nur geringfügig (Spur 3). Nach 150s Dunkelheit jedoch wuchs die initiale Fluoreszenz deutlich an (Spur 4). Auch hier folgt somit ein thermischer Reaktionsschritt der Photo-reaktion. Nachfolgende UV-Anregungen von jeweils 150s Dauer führten zu weiterem Anstieg der blauangeregten Fluoreszenz (Spuren 5 und 6). Wie in Spuren 7 bis 9 gezeigt, konnte die durch UV-Strahlung angeregte Fluoreszenz durch 150s Blaubelichtungen wieder vollständig regeneriert werden. Auch hier scheint ein photoreversibles Fluorophorsystem aus einem im UV absorbierenden Fluorophor  $A_{DR}$  und einem im Blauen absorbierenden Fluorophor  $B_{DR}$  vorzuliegen, vergleichbar mit dem der Fliegenrhabdomere.

### 3.5.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

---

Anregungsspektren des blauabsorbierenden Fluorophors  $A_{DR}$  wurden von unbelichteten, blau- und UV-belichteten Rhabdomeren aufgenommen (Abb.39a,  $\lambda_m = 568nm$ ). Das Anregungsspektrum der dunkeladaptierten Rhabdomere zeigte ein schwaches Maximum bei 345nm und stieg oberhalb 480nm steil an (Kurve 1). Wie aus dem Vergleich mit den Anregungsspektren nach UV- bzw. Blaubelichtung hervorgeht, änderte sich die Fluoreszenz in diesem Spektralbereich nicht. Es ist anzunehmen, daß diese Fluoreszenz von den die Rhabdomere umhüllenden Tracheolen stammt. Nach dreiminütiger UV-Belichtung stieg die Fluoreszenz im Anregungsbereich zwischen 390 und 480nm gegenüber dem Ausgangsspektrum deutlich an (Abb.39a, Kurve 2). Nachfolgende Blaubelichtung reduzierte die Fluoreszenz wieder bis auf das Ausgangsniveau

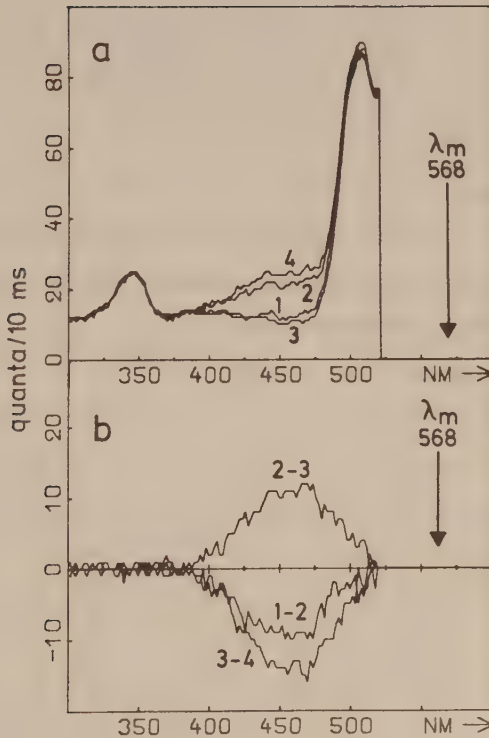


Abb.39

Änderung der Anregungsspektren der Photorezeptoren von *Drosophila* nach UV- und Blauadaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 568nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Photorezeptoren. Kurve 2: Nach 3 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließenden 3 Minuten Blauadaptation. Kurve 4: Nach anschließender dreiminütiger UV-Adaptation. Beachte die vollständige Reversibilität. **b.** Differenzspektren aus den in a. gezeigten Kurven gerechnet. Beachte die maximale Modulation um 470nm. Die Modulation zeigt die Bildung des Fluorophors  $B_{DR}$  und seine Rückführung in  $A_{DR}$ . Beachte weiterhin die gute Übereinstimmung mit den Anregungsdifferenzspektren der Fliegenrhabdomere (vergl. Abb.13).

(Kurve 3), anschließende UV-Belichtung bewirkte einen erneuten Anstieg (Kurve 4). Dieses System ist somit vollständig reversibel. Die korrespondierenden Differenzspektren (Abb.39b) geben näherungsweise die Absorptionseigenschaften des im Blauen absorbierenden Fluorophors  $B_{DR}$  wieder. Sie deuten auf ein Absorptionsmaximum nahe 460nm. Aus diesen Differenzspektren folgt, daß der Fluorophor  $B_{DR}$  durch Blaustrahlung wieder in  $A_{DR}$  umgewandelt wird.

Das bei der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 463\text{nm}$  ermittelte Anregungsdifferenzspektrum (Abb.40a,b) gibt näherungsweise das Absorptionsspektrum des Fluorophors  $A_{DR}$  an. Maximale Absorption wurde bei 380nm gefunden.

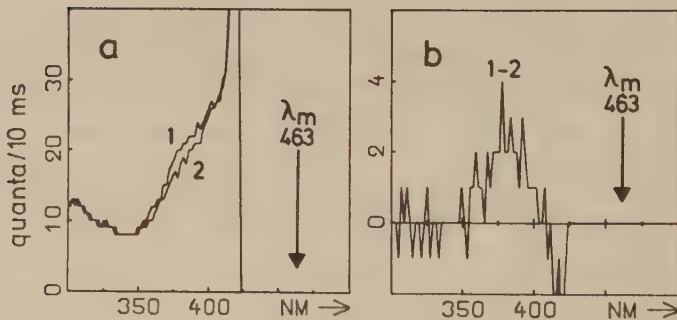


Abb.40

Änderung des Anregungsspektrums der Photorezeptoren von *Drosophila* nach UV-Adaptation. a. Originalspektren (Meßwellenlänge 463nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Photorezeptoren. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. b. Differenzspektrum gerechnet aus den in a. gezeigten Kurven. Die Modulation bei 380nm zeigt die Umwandlung des Fluorophors  $A_{DR}$ .

### 3.5.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

Emissionsspektren der Rhabdomere wurden von unbelichteten Rhabdomeren und nach UV- bzw. Blauadaptation bei den Anregungswellenlängen 360, 380 und 410nm aufgenommen. Die Emissionsspektren dunkel- bzw. UV-adaptierter Rhabdomere sind in Abb.41 gezeigt ( $\lambda_i = 380\text{nm}$ ). Bei dieser Anregungswellenlänge bewirkte UV-Adaptation eine Emissionsabnahme um 450nm und eine Zunahme um 520nm. Die korrespondierenden Differenzspektren (Abb.42) zeigen, daß bei 360nm offensichtlich nur der Fluorophor  $A_{DR}$  (untere Kurve), hingegen bei 410nm nur Fluorophor  $B_{DR}$  (obere Kurve) angeregt wird. Maximale Emission trat bei 470 bzw. um 530nm auf. Bei Anregung mit 380nm (mittlere Kurve) wurden beide Fluorophore angeregt. Da der Fluorophor  $A_{DR}$  bei dieser Anregungswellenlänge noch etwas stärker fluoresziert als  $B_{DR}$ , dürfte die Wellenlänge, bei der beide Fluorophore gleich stark angeregt werden, bei etwa 390nm liegen.

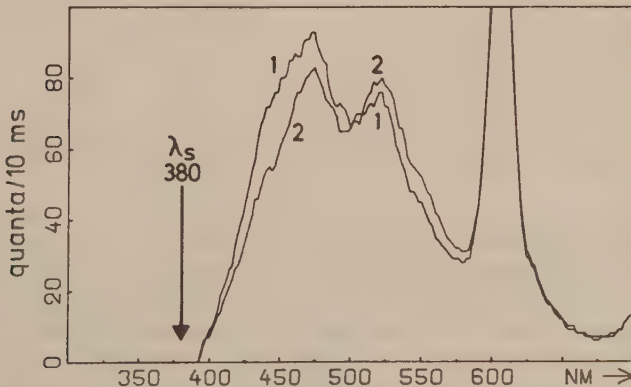


Abb.41

Änderung des Emissionsspektrums der Photorezeptoren von *Drosophila* nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 380nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Photorezeptoren. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Beachte die Abnahme der Emission bei 440nm und ihre Zunahme bei 530nm.

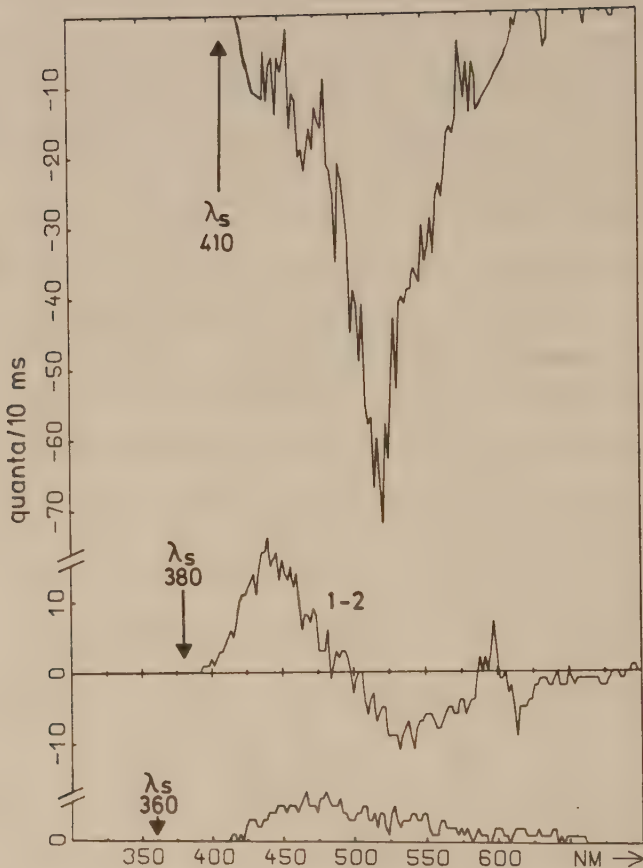


Abb.42

Abhängigkeit der Emissionsdifferenzspektren von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 360, 380$  und  $410\text{nm}$ ). Es wurde jeweils das Emissionsspektrum nach UV-Adaptation vom Emissionsspektrum der dunkeladaptierten Photorezeptoren subtrahiert. Kurve  $\lambda_s 380$  ist die Differenz des in Abb.41 gezeigten Kurvenpaares. Anregung mit  $410\text{nm}$  führt zu einer maximalen Emissionsänderung bei  $525\text{nm}$ . Anregung mit  $380\text{nm}$  führt zu einer Abnahme der Emission bei  $440\text{nm}$ , einer nahezu gleich großen Zunahme bei  $530\text{nm}$  und einem Isoemissionpunkt bei  $495\text{nm}$ . Anregung mit  $360\text{nm}$  bedingt Abnahme der Fluoreszenz bei  $440\text{nm}$ . Spektrum  $\lambda_s 410$  entspricht dem invertierten Emissionsspektrum des Fluorophors  $B_{DR}$ , Spektrum  $\lambda_s 360$  dem des Emissionsspektrums des Fluorophors  $A_{DR}$ .

Auch in den Rhabdomeren von *Deilephila* liegt somit ein dem Fluorophorsystem der Fliegenrhabdomere vergleichbares System vor. Absorptions- und Emissionsmaxima sind gegenüber denen der Fliegenrhabdomere nur unwesentlich verschoben. Die korrigierten Spektren sind in Abbildung 43 dargestellt. Der Fluorophor  $A_{DR}$  hat danach ein Absorptionsmaximum bei 370nm und ein Emissionsmaximum bei 450nm. Das Absorptionsmaximum des Fluorophors  $B_{DR}$  liegt bei 470 nm, sein Emissionsmaximum bei 550 nm.

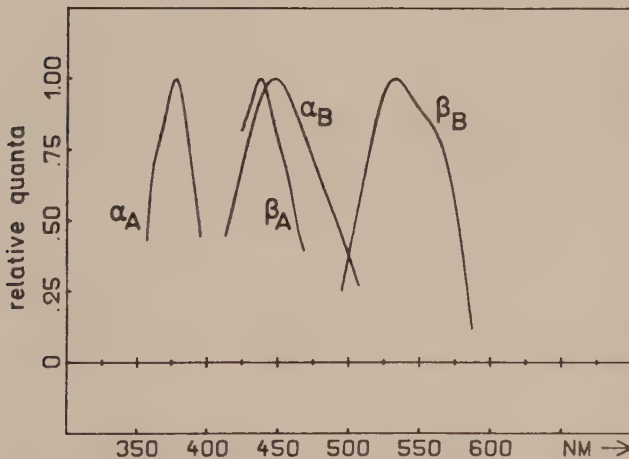


Abb.43

Korrigierte Anregungs- und Emissionsspektren des photoreversiblen Fluorophorsystems der Photorezeptoren von *Deilephila*. Die Spektren beruhen auf einem primären Farbstoff  $A_{DR}$  mit maximaler Absorption bei 380nm und maximaler Emission bei 450nm und einem sekundären Farbstoff  $B_{DR}$  mit maximaler Absorption bei 440nm und maximaler Emission bei 540nm. Die Spektren wurden aus in den Abbildungen 39, 40 und 42 gezeigten Rohspektren gewonnen, auf Eins normiert und leicht geglättet. Beachte die große Übereinstimmung mit dem Fluorophorsystem in den Fliegenrhabdomeren (vergl. Abb.17).

### 3.6. Das Fluorophorsystem in den Semperzellen von *Deilephila*

---

Das Fluorophorsystem der Semperzellen konnte aufgrund seiner hohen Fluoreszenz eingehender untersucht werden.

In Abbildung 44 ist der subjektive Eindruck bei Beobachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt. Bei Blaubestrahlung emittierte der Verband aus Semperzellen und Kristallkegeln eine gelbgrüne Fluoreszenz niedriger Intensität. Nach einer zwischenzeitlichen UV-Belichtung war diese erheblich angestiegen, um dann innerhalb weniger Sekunden wieder an Intensität zu verlieren.

#### 3.6.1. Photokinetik der Fluorophore

---

Wie in Abbildung 45a Spur 1 gezeigt, regte Blaustrahlung eine schwache Fluoreszenz an, deren Intensität nur leicht bis auf einen konstanten Endwert abnahm. Während der anschließenden UV-Anregung sank die Fluoreszenz zunächst innerhalb von Sekunden auf einen Minimalwert ab, um dann erneut anzusteigen (Spur 2). Dieser Zeitverlauf spricht wie bei den Fliegenrhabdomeren für einen diphasischen Prozeß. Im Anschluß daran löste ein Blaustimulus eine etwa zweieinhalbfach höhere Fluoreszenz wie zu Beginn des Experiments aus, die innerhalb 30s um etwa ein Drittel abnahm (Spur 3).

Wie in Abbildung 45b gezeigt, stieg bei unbelichteten Semperzellen die durch Blau angeregte Fluoreszenz an, während sie nach UV-Belichtung nur abnahm. Diese Zeitverläufe weisen auch für die blauangeregte Fluoreszenz auf einen diphasischen Prozeß hin.

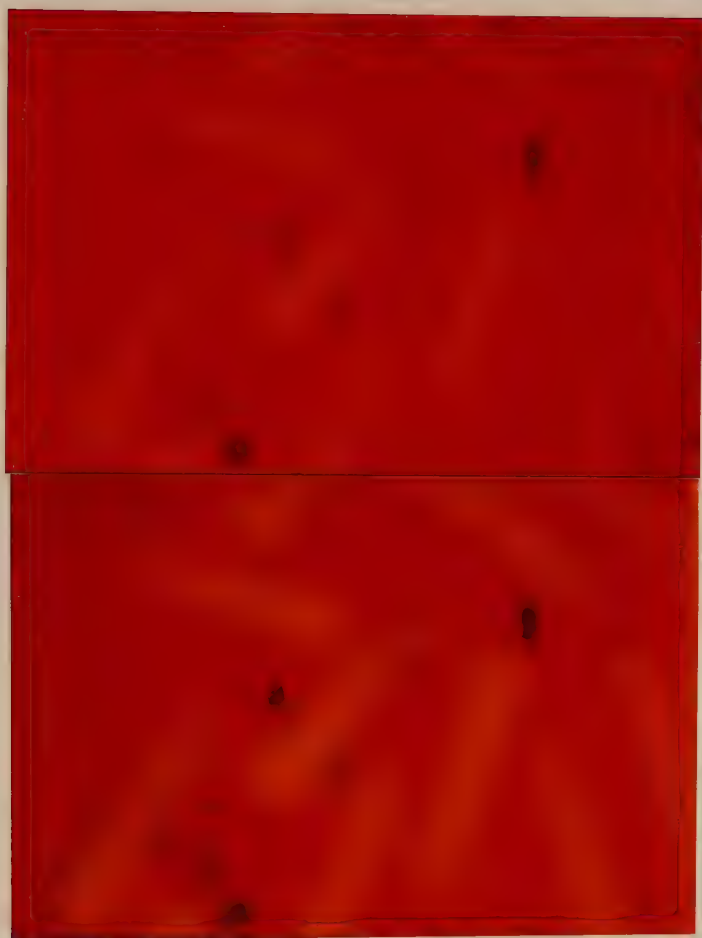


Abb. 44

Isolierte Kristallkegel mit Semperzellen von *Deilephila* bei rotem Hintergrundlicht und additiver Blaustrahlung zur Anregung der Fluoreszenz (Kantenfilter EF = K530). a. Dunkeladaptierte Kristallkegel mit Semperzellen. Es ist nur eine schwache gelbe Fluoreszenz erkennbar. b. Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Die gelbe Fluoreszenz hat deutlich an Intensität zugenommen. Die Intensität ging nach wenigen Sekunden wieder zurück, war aber durch anschließende UV-Adaptation wieder regenerierbar.

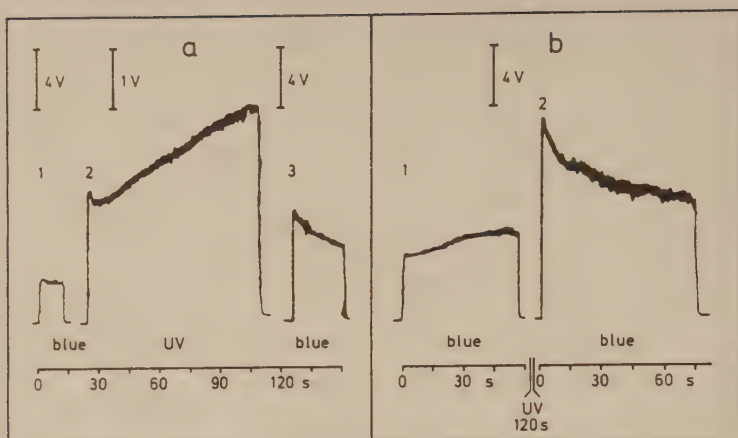


Abb.45

Kinetik der Fluoreszenz isolierter Semperzellen von *Deilephila* (Meßwellenlänge 520nm). **a.** Zeitverlauf der Fluoreszenz bei alternierender Blau- und UV-Anregung. **Spur 1:** Intensitätsabnahme der Fluoreszenz dunkeladaptierter Semperzellen während Blauanregung. **Spur 2:** Abnahme und nachfolgender Anstieg der Fluoreszenzintensität während UV-Anregung. **Spur 3:** Abnahme der blauangeregten Fluoreszenz unmittelbar nach Ende der UV-Anregung. Beachte die diphasische Kinetik während UV-Anregung. **b.** Blauangeregte Fluoreszenz vor und nach UV-Adaptation. **Spur 1:** Dunkeladaptierte Semperzellen. **Spur 2:** Nach 150s UV-Adaptation. Beachte die gegenläufige Kinetik.

### 3.6.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

Das Anregungsspektrum ( $\lambda_m = 568\text{nm}$ ) unbelichteter Semperzellen zeigte im UV-Bereich eine schwache Hintergrundfluoreszenz, ein Maximum von 400 bis 425nm und ein Nebenmaximum um 470nm (Abb. 46a, Kurve 1). Nach UV-Belichtung stieg die Fluoreszenz in der Region zwischen 360 und 470nm deutlich an (Kurve 2). Nach anschließender Blaubelichtung wuchs die Fluoreszenz um 400nm noch weiter an, verlor dafür aber im Bereich zwischen 430 und 500nm deutlich an Intensität (Kurve 3). Die in Abbildung 46b gezeigten Differenzspektren deuten darauf hin, daß ein primärer, im UV absorbierender Fluorophor  $A_{99}$  durch UV-Strahlung in

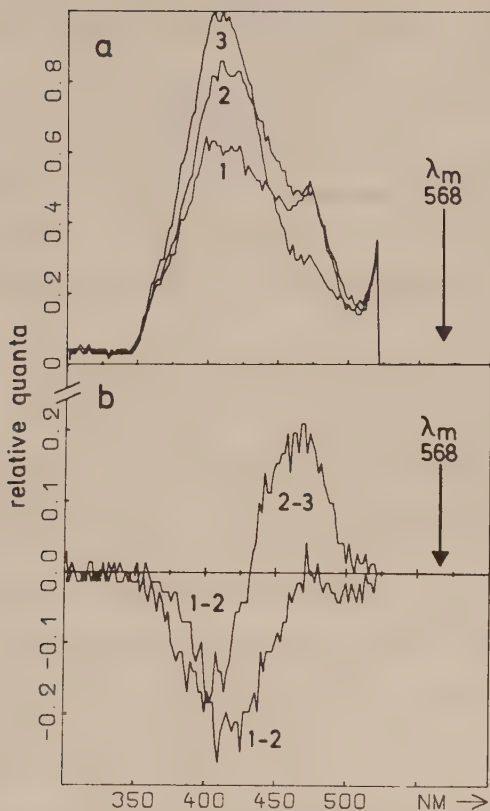


Abb. 46

Änderung des Anregungsspektrums der Semperzellen von *Deilephila* nach UV- und Blauadaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 568nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 3 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließender dreiminütiger Blauadaptation. **b.** Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. UV-Adaptation führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz bei 420nm (1-2). Blauadaptation bedingt weitere Zunahme der Fluoreszenz bei 405nm aber Abnahme der Fluoreszenz bei 470nm. Diese Modulationen deuten auf eine starke Überlappung der Absorptionsspektren der Fluorophore  $A_{ps}$  und  $B_{ps}$  in diesem Bereich sowie auf eine durch Blau modulierbare Absorptionsbande um 470nm.

einen um 400nm absorbierenden Fluorophor  $B_{DS}$  überführt wird (Kurve 1-2). Letzterer besitzt eine niedrigere Absorptionsbande um 470nm. Blaubestrahlung führt zum Rückgang dieser Bande und einer Absorptionzunahme um 405nm (Kurve 2-3).

Die Absorptionsspektren des primären Fluorophors  $A_{DS}$  und des Folgefluorophors  $B_{DS}$  überlappen sehr stark im UV-Bereich, wie die bei 450nm gemessenen Anregungsspektren zeigen (Abb. 47a). Die geringe Absorptionsdifferenz um 350nm deutet darauf hin, daß  $A_{DS}$  nur geringfügig kürzerwellig im UV absorbiert als  $B_{DS}$  (Abb.47b).

### 3.6.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

Zusätzliche Informationen über die Absorptionseigenschaften der Fluorophore lassen sich anhand der Emissionsspektren unbelichteter, blau- und UV-belichteter Semperzellen gewinnen. Aus den bei Anregung mit 380nm aufgenommenen Emissionsspektren (Abb.48) geht hervor, daß offensichtlich auch die Emissionsspektren von  $A_{DS}$  und  $B_{DS}$  nur geringfügig voneinander abweichen. Das in Kurve 1 gezeigte Emissionsspektrum unbelichteter Semperzellen dürfte hauptsächlich auf  $A_{DS}$  zurückgehen. Kurve 2 beruht wohl überwiegend auf Emission von  $B_{DS}$ , und deutet darauf hin, daß dessen Absorptions- und/oder Emissionswahrscheinlichkeit höher ist als die von  $A_{DS}$ . Kurve 3, sowie die in Abbildung 49 gezeigten Differenzspektren ( $\lambda$ , 360, 380, 400 und 420) legen den Schluß nahe, daß durch Blau (Kurven 1-2) ein Intermediärfarbstoff  $C_{DS}$  aus  $B_{DS}$  gebildet wird, während durch nachfolgende UV-Adaptation offensichtlich aus  $A_{DS}$   $B_{DS}$  (Kurven 2-3) entsteht. Bei Anregung mit 500nm bewirkte Blaubestrahlung eine Emissionsabnahme um 550nm (Kurve 1-2), UV-

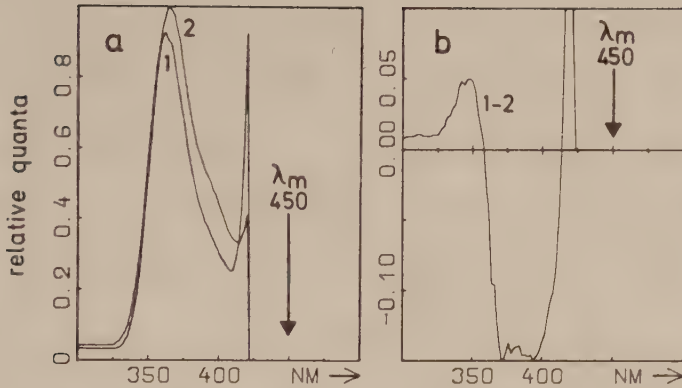


Abb. 47

Änderung des Anregungsspektrums der Semperzellen von *Deilephila* nach UV-Adaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 450nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 8 Minuten UV-Adaptation. **b.** Differenzspektren gerechnet aus den Spektren von a. Maximale Modulation um 350nm und oberhalb 370nm. Die Modulation bei 350nm korrespondiert mit der Abnahme des Fluorophors  $A_{ps}$ , die Modulation bei 380nm mit der Zunahme von  $B_{ps}$ . Dieses Differenzspektrum spricht für eine starke Überlappung beider Anregungsspektren auch im UV-Bereich.

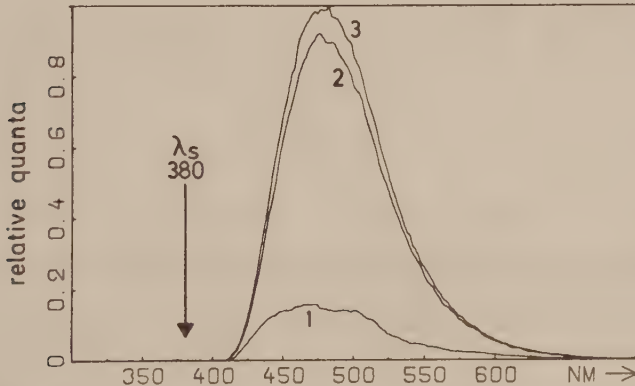


Abb. 48

Änderung des Emissionsspektrums der Semperzellen von *Deilephila* nach UV- und Blauadaptation (Anregungswellenlänge 380nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 4 Minuten Blau-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließender vierminütiger UV-Adaptation. Beachte 1., daß die Emission bei 475nm sowohl nach Blau- als auch nach UV-Adaptation anwächst und 2. die nahezu gleiche Lage aller Emissionspeaks.

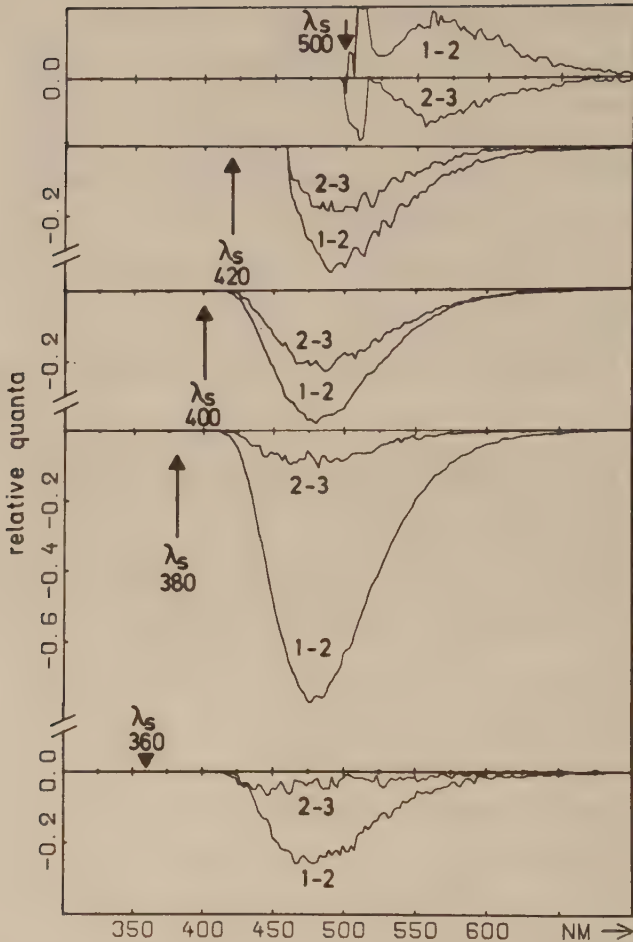


Abb. 49

Abhängigkeit der Emissionsdifferenzspektren von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s$  = 360, 380, 400, 420 und 500 nm). Die Differenzspektren wurden nach Blauadaptation (Kurve 1-2: unbelichtete minus blauadaptierte Semperzellen) und anschließender UV-Adaptation (Kurve 2-3: blauadaptierte minus UV-adaptierte Semperzellen) aufgenommen. Die Kurven  $\lambda_s$  380 sind die Differenzen der in Abbildung 48 gezeigten Spektren. Kurven  $\lambda_s$  360, 380, 400 und 420 nm: Maximale Zunahme der Emission bei 475 nm sowohl nach Blau- als auch nach UV-Adaptation; während bei  $\lambda_s$  500 die Emission durch Blau- und UV-Adaptation plus-minus moduliert wird (570 nm). Dieser Befund spricht dafür, daß die Emissionsspektren und damit auch deren Absorptionsspektren sehr ähnlich sind und sich nur deutlich im Langwelligen (bei  $\lambda_s$  500) unterscheiden.

Strahlung hingegen eine ähnlich große Emissionszunahme in dieser Region (Kurve 2-3). Diese reversible Emissionsmodulation korrespondiert mit der Absorptionsmodulation um 470nm (s. Abb. 46a). Dieser Befund deutet darauf hin, daß 1. der Fluorophor  $B_{DS}$  schon in einer gewissen Konzentration vorliegt und 2. ein photoreversibles System aus den Fluorophoren  $B_{DS}$  und  $C_{DS}$  besteht. Die Emissionseigenschaften aller drei Fluorophore sind sehr ähnlich. Maximale Emissionsdifferenz von  $B_{DS}$  gegenüber  $A_{DS}$  und  $C_{DS}$  besteht um 550nm.

#### 3.6.4. Abhängigkeit der Fluoreszenz vom extrazellulären pH-Wert

Die UV-induzierte Zunahme des Fluorophors  $B_{DS}$  wurde durch Aufnahme von Anregungsspektren ( $\lambda_m = 568nm$ ) bestimmt. Kristallkegel mit anhaftenden Semperzellen jeweils eines Auges wurden auf sechs verschiedene 0.05 M Phosphatpufferlösungen mit sechs verschiedenen pH-Werten aufgeteilt. Das Verhältnis von Natrium- zu Kaliumionen wurden bei allen Proben unabhängig vom pH-Wert konstant gehalten. Anregungsspektren wurden von un- und UV-belichteten Semperzellen aufgenommen. Die Amplituden der Differenzspektren wurden vermessen und auf das Maximum der Amplitude bei pH 4.7 normiert. Mit sinkendem pH wuchs die relative Amplitudenmodulation, d.h. die photochemische Umwandlungsrate des Fluorophors  $A_{DS}$  in  $B_{DS}$  stieg mit sinkendem pH. Die Meßpunkte lassen sich hier eher durch eine theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten von 1 (Fliegenrhabdomere  $n = 2$ , s. Abb. 22) beschreiben; der pK-Punkt liegt bei etwa 6 (Abb. 50).

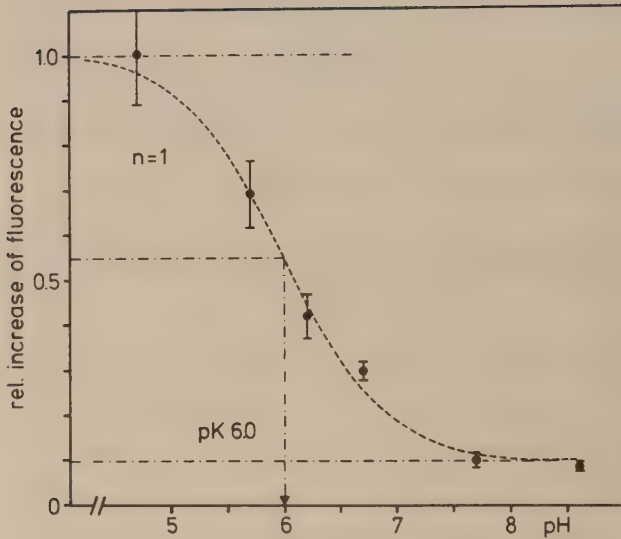


Abb. 50

pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzmodulation des Fluorophors  $B_{ps}$  der Semperzellen von *Deilephila* nach UV-Adaptation (Meßwellenlänge 568nm; bei konstantem Verhältnis von  $Na^+$ - und  $K^+$ -Ionen). Die Datenpunkte beschreiben den Fluoreszenzanstieg dunkeladaptierter Semperzellen nach 8 Minuten UV-Adaptation. Jeder Datenpunkt ist das Mittel nebst Standardabweichung von sechs Meßreihen an sechs Augen. Jede Meßreihe wurde in sich auf die Modulation bei pH 4.7 normiert. Unterbrochene Linie: Theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten  $n = 1$  bei einem  $pK = 6.0$ , welche die experimentell gefundenen Daten recht gut beschreibt.

### 3.7. Das Fluorophorsystem in der Cornea von Deilephila

---

Ein dem der Cornea von Calliphora sehr ähnliches Fluorophorsystem wurde auch in der Cornea von Deilephila gefunden.

Seitlich belichtete Corneasnitte zeigen, daß die Fluoreszenz hauptsächlich aus dem Inneren der Cornealinse stammt. Die Fluorophore scheinen in die Schichten, die die Zonen unterschiedlicher Brechungsindices voneinander trennen, eingelagert zu sein (Abb.51).



Abb.51

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Querschnittpräparates der Cornea von Deilephila (Anregung mit UV-Licht; Kantenfilter EF = K460). Beachte die strenge Lokalisierung der Fluoreszenz auf die Grenzschichten unterschiedlicher Brechungsindices und auf die Randzonen jeder Linse.

#### 3.7.1. Photokinetik der Fluorophore

---

Wie in Abbildung 52, Spur 1 gezeigt, regte Blaustrahlung eine Fluoreszenz an, die kontinuierlich abfiel und sich nach 60s einem Endwert näherte. Der Zeitverlauf der Fluoreszenz war bei UV-Belichtung ähnlich (Spur 2). Der Initialwert der nach-

folgenden Blaubelichtung (Spur 3) überstieg den Endwert der ersten Blaubelichtung, war aber deutlich niedriger als der Ausgangswert von Spur 1. Nach erneuten 60s UV-Belichtung erreichte die Initialamplitude der mit Blau angeregten Fluoreszenz wieder den Wert der vorausgegangenen Blaubelichtung (Spuren 4 und 5). Aber auch nach 60s Dunkelpause überstieg der Initialwert der blauangeregten Fluoreszenz leicht den Endwert der vorangegangenen Blaubelichtung (Spur 6). Daher muß auch hier eine thermische Reaktion bei der Umwandlung des Fluorophors  $A_{DC}$  in den Fluorophor  $B_{DC}$  beteiligt sein.

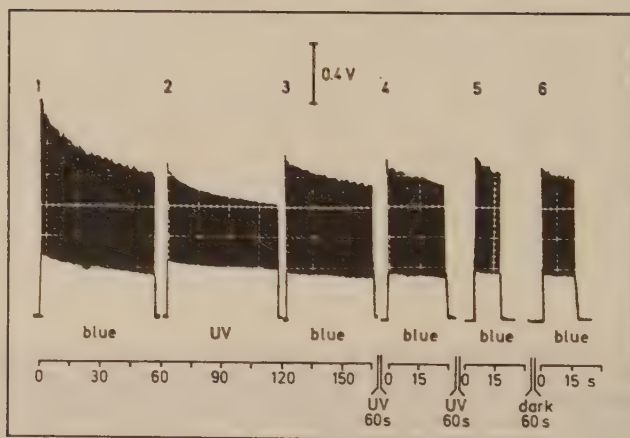


Abb.52

Kinetik der Fluoreszenz der isolierten Cornea von *Deilephila* während alternierender Blau- und UV-Anregungen (Meßwellenlänge 520nm). Spur 1: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz der dunkeladaptierten Cornea während Blauanregung. Spur 2: Abnahme der Fluoreszenz während UV-Anregung. Spur 3: Abnahme der Fluoreszenz während Blauanregung unmittelbar nach Ende der UV-Anregung. Spuren 4 und 5: Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz nach jeweils 60s UV-Adaptation. Spur 6: Kinetik der blauangeregten Fluoreszenz nach 60s Dunkelheit. Beachte den jeweiligen Anstieg der Initialamplitude der blauangeregten Fluoreszenz über den Endwert der vorangegangenen Blauanregung.

### 3.7.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

---

Von der unbelichteten, UV- und blauadaptierten Cornea wurden Anregungsspektren ( $\lambda_m = 568\text{nm}$ ) registriert und die korrespondierenden Differenzspektren berechnet. Das Anregungsspektrum der unbelichteten Cornea durchlief ein Maximum um  $410\text{nm}$  und ein Nebenmaximum bei  $470\text{nm}$  (Abb.53a, Kurve 1). UV-Adaptation verursachte eine Fluoreszenzabnahme um  $390\text{nm}$  und eine geringe Zunahme um  $470\text{nm}$ ; Blauadaptation hingegen eine Abnahme der Fluoreszenz (Maximum bei  $470\text{nm}$ ) über den Spektralbereich zwischen  $400$  und  $520\text{nm}$  und eine minimale Zunahme um  $380\text{nm}$  (Abb.53b, Kurven 1-2 und 2-3).

Die bei  $450\text{nm}$  gemessenen Anregungsspektren und das daraus gerechnete Differenzspektrum (Abb.54a, b) zeigten nach UV-Adaptation maximale Reduktion der UV-Absorptionsbande um  $380\text{nm}$ .

### 3.7.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

---

UV-Belichtung bewirkte eine breitbandige Emissionsabnahme zwischen  $440$  und  $525\text{nm}$  (Abb.55, Kurve 2;  $\lambda_i = 380\text{nm}$ ), wohingegen Blauadaptation vorwiegend eine Emissionszunahme um  $460\text{nm}$  (Kurve 3) bedingte. Wie aus den Differenzspektren (Abb.56) zu ersehen, verursachten auch bei Anregung mit  $400\text{nm}$  UV-Adaptation eine Emissionsabnahme (Kurve 1-2) und Blauadaptation eine Emissionszunahme (Kurve 2-3). Sowohl bei Anregung mit  $380$  als auch bei Anregung mit  $400\text{nm}$  betrug die Emissionszunahme nur etwa ein Drittel der Abnahme.

Diese Befunde deuten auf einen Fluorophor  $A_{DC}$ , der durch UV in  $B_{DC}$  überführt wird. Letzterer wird durch Blaustrahlung nur partiell nach  $A_{DC}$  rückgeführt.

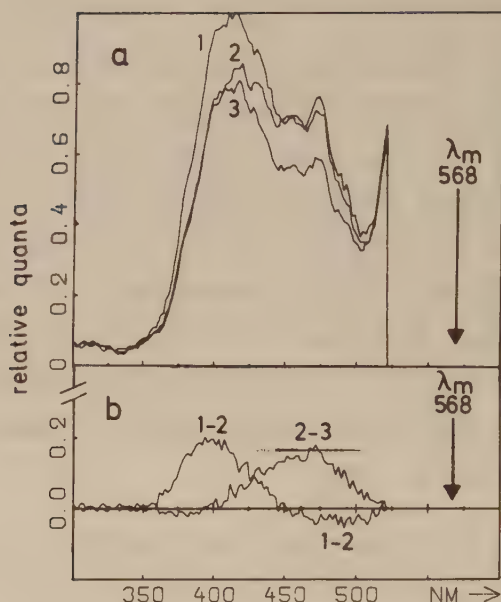


Abb.53

Änderung des Anregungsspektrums der isolierten Cornea von *Deilephila* nach UV- und Blauadaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 568nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Cornea. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließenden 4 Minuten Blauadaptation. **b.** Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. Kurve 1-2: Maximale Modulation um 400nm und geringe Modulation um 475nm. Kurve 2-3: Maximale Modulation bei 475nm. Beachte die Überlappung beider Differenzspektren.

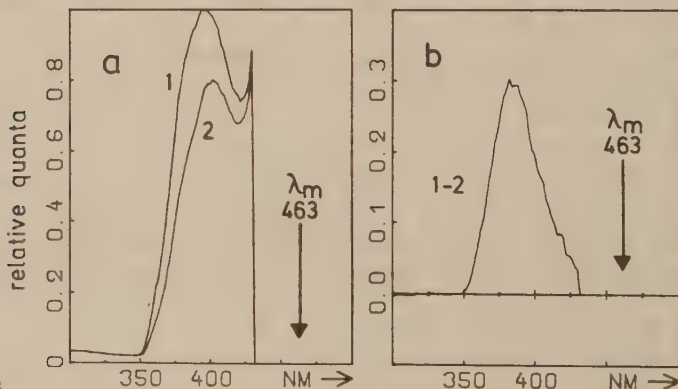


Abb.54

Änderung des Anregungsspektrums der isolierten Cornea von *Deilephila* nach UV-Adaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 463nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Cornea. Kurve 2: Nach 6 Minuten UV-Adaptation. **b.** Differenzspektrum gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. Beachte die maximale Modulation bei 380nm. Diese beschreibt den Abbau des Fluorophors  $A_{DC}$ .

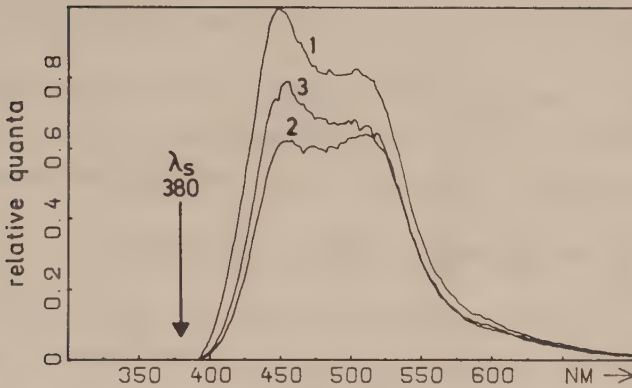


Abb. 55

Änderung des Emissionsspektrums der isolierten Cornea von *Delphila* nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 380nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Cornea. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließenden 4 Minuten Blauadaptation. Beachte die Emissionsabnahme nach UV-Adaptation und die partielle Regeneration nach Blauadaptation.

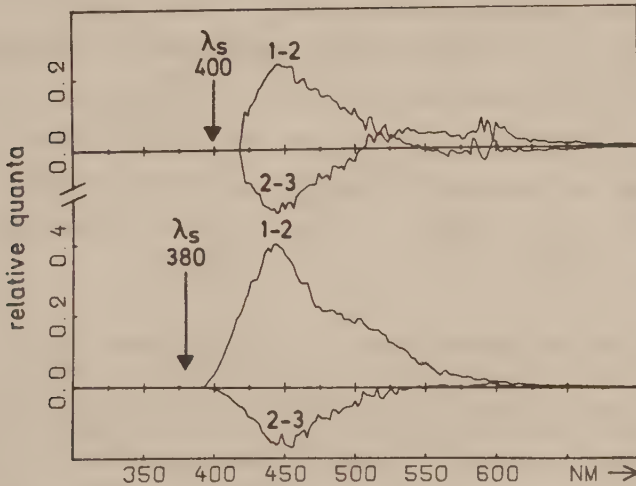


Abb. 56

Abhängigkeit des Emissionsdifferenzspektrums von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 380$  und  $400$ nm). Die Differenzspektren wurden nach UV-Adaptation (Kurve 1-2: dunkeladaptierte minus UV-adaptierte Cornea) und Blauadaptation (Kurve 2-3: UV-adaptierte minus blauadaptierte Cornea) aufgenommen. Kurven  $\lambda_s 380$  1-2 und 2-3 sowie  $\lambda_s 400$  1-2 und 2-3: Maximale Modulation bei 450nm. Beachte die Abnahme der Fluoreszenz und ihre partielle Regeneration. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Emissionsspektren und somit auch die Absorptionsspektren (s. Abb. 53) der Fluorophore  $A_{DC}$  und  $B_{DC}$  sehr ähnlich sind.

### 3.8. Das Fluorophorsystem in den Semperzellen von Ascalaphus

---

Einige Pilotversuche zeigten, daß auch in den Semperzellen von Ascalaphus ein Fluorophorsystem existiert. Es konnten aber nur einige unvollständige Messungen durchgeführt werden.

#### 3.8.1. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

---

Dunkeladaptierte Semperzellen zeigten ein Anregungsspektrum ( $\lambda_m = 568\text{nm}$ ) mit schwacher Hintergrundfluoreszenz im UV-Bereich und einem leichten Fluoreszenzanstieg in der Region zwischen 400 und 490nm (Abb.57a, Kurve 1). Nach UV-Belichtung zeigte das Anregungsspektrum eine beträchtliche Zunahme im Bereich zwischen 400 und 480nm (Kurve 2), die von der nachfolgenden Blaubelichtung praktisch vollständig rückgängig gemacht wurde (Kurve 3). Die korrespondierenden Differenzspektren (Abb.57b) geben näherungsweise die Absorptionseigenschaften des photoreversiblen Fluorophors  $B_{AS}$  mit einem Absorptionsmaximum um 450 nm an. Das Differenzspektrum bei der Meßwellenlänge  $\lambda_m = 468\text{nm}$  (Abb.58a, b) gibt näherungsweise das Absorptionsspektrum des Fluorophors  $A_{AS}$  wieder. Das Absorptionsmaximum liegt bei etwa 390nm.

#### 3.8.2. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

---

Charakteristische Emissionsspektren unbelichteter bzw. UV-adaptierter Semperzellen sind in Abbildung 59 gezeigt ( $\lambda_i = 400\text{nm}$ ). UV-Adaptation bewirkte einen deutlichen Emissionszuwachs um 540nm (Kurve 2). Differenzspektren (Abb.60) zeigen, daß mit 380nm vorwiegend der Fluorophor  $A_{AS}$  angeregt, und somit das Emissionsspektrum dieses Fluorophors wiedergegeben wird. Bei Anregung mit 400nm wurde dagegen vorwiegend der

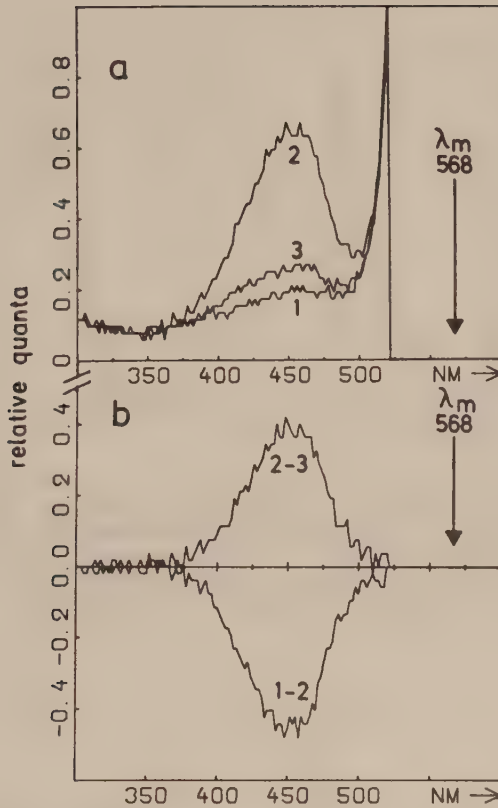


Abb.57

Änderung des Anregungsspektrums der Semperzellen von *Ascalaphus* nach UV- und Blauadaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 568nm). Kurve 1: Unbelichtete Semperzellen. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließenden 4 Minuten Blauadaptation. **b.** Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. Maximale Modulation bei 450nm. Die Modulationen beschreiben die Bildung (1-2) und die Überführung (2-3) des Fluorophors  $B_{AS}$ . Beachte die nahezu vollständige Reversibilität.

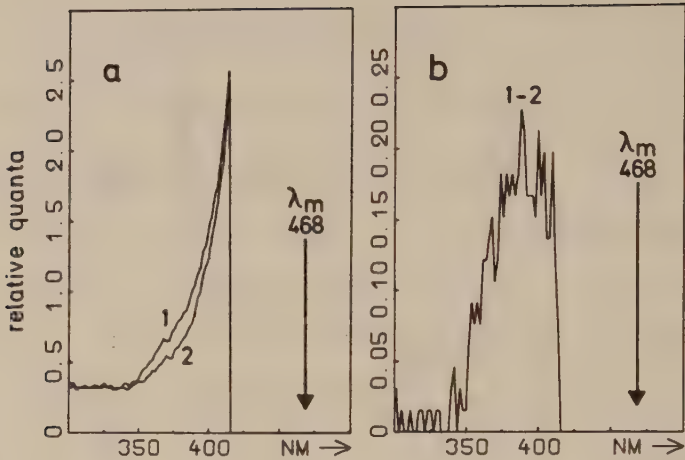


Abb. 58

Änderung des Anregungsspektrums der Semperzellen von *Ascalaphus* nach UV-Adaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 468nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Semperzellen. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. **b.** Differenzspektrum gerechnet aus den in a. gezeigten Kurven. Die maximale Modulation bei 380nm beschreibt die Überführung des Fluorophors  $A_{AS}$ .

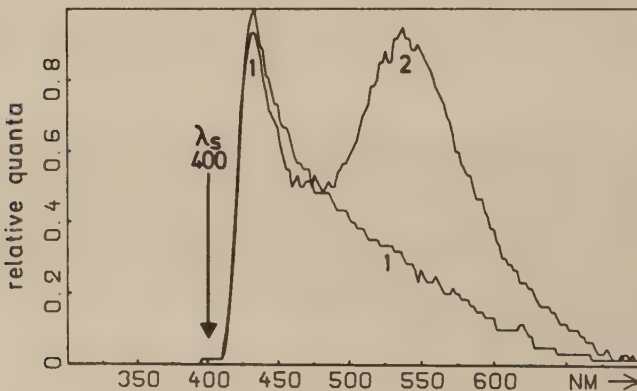


Abb. 59

Änderung des Emissionsspektrums der Semperzellen von *Ascalaphus* nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 400nm). Kurve 1: Unbelichtete Semperzellen. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Beachte die Emissionszunahme bei 540nm.

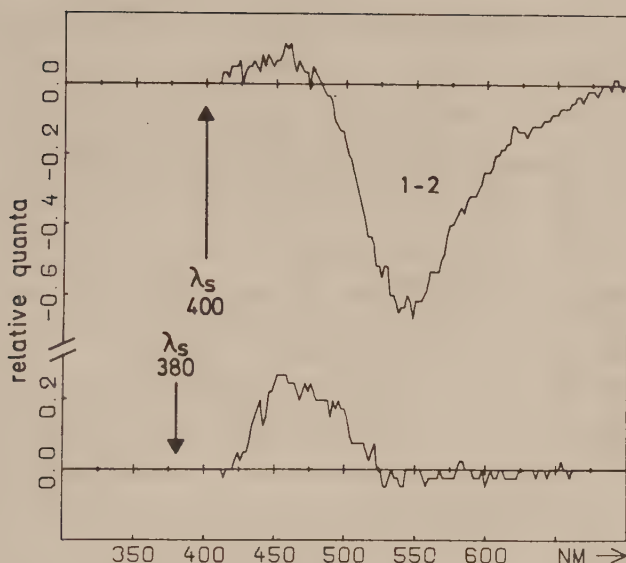


Abb. 60

Abhängigkeit der Emissionsdifferenzspektren von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 380, 400 \text{ nm}$ ). Beide Differenzspektren wurden von einem Semperzellenpräparat (unbelichtete minus UV-adaptierte Semperzellen) aufgenommen. Kurve  $\lambda_s 400$  ist die Differenz aus den in Abbildung 59 gezeigten Spektren. Spektrum  $\lambda_s 400$  beschreibt annähernd das invertierte Emissionsspektrum des Fluorophors  $B_{AS}$ , Spektrum  $\lambda_s 380$  annähernd das von  $A_{AS}$ .

Fluorophor  $B_{AS}$  angeregt. Somit entspricht dieses Differenzspektrum näherungsweise dem Emissionsspektrum von  $B_{AS}$ . Nach Abbildung 61 liegt das Absorptionsmaximum vom Fluorophor  $A_{AS}$  bei 390 nm und sein Emissionsmaximum bei 450 nm. Der Fluorophor  $B_{AS}$  absorbiert hingegen maximal bei 450 nm und emittiert bei 540 nm maximal.

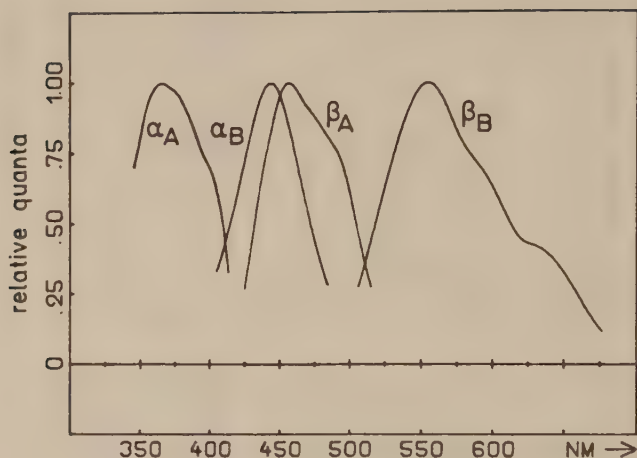


Abb.61

Korrigierte Anregungs- und Emissionsspektren des photoreversiblen Fluorophorsystems der Semperzellen von *Ascalaphus*. Die Spektren beruhen auf einem primären Farbstoff  $A_{AS}$  mit maximaler Absorption bei 370nm und maximaler Emission bei 450nm und einem sekundären Farbstoff  $B_{AS}$  mit maximaler Absorption bei 430nm und maximaler Emission bei 550nm. Die Spektren wurden aus den in den Abbildungen 57, 58 und 60 gezeigten Rohspektren gewonnen, auf Eins normiert und leicht geglättet.

### 3.9. Fluoreszenzmessungen an Fliegenaugen in vivo

---

Die Photokinetik der Fluoreszenz intakter Augen wurde an immobilisierten Fliegen des Wildtyps und der Mutanten "Chalky" und "Lemon" gemessen. Wie in Abbildung 62 gezeigt, unterschieden sich weder die Zeitverläufe noch die Amplitudenmodulationen der Fluoreszenz der Mutante "Chalky" wesentlich von denen der isolierten Cornea (vergl. Abb.33). Daher wurde unter diesen Versuchsbedingungen vorwiegend die corneale Fluoreszenz registriert. Die Kinetik der Fluoreszenz des Auges der Mutante "Lemon" unterschied sich nicht von der bei "Chalky" registrierten. Vergleichbares gilt auch für die Augen des Wildtyps (Abb.63). Allerdings war die Intensität der blauangeregten Fluoreszenz erheblich niedriger, vermutlich weil die Schirmpigmente einen essentiellen Teil der Anregungsstrahlung absorbieren.

Die durch UV- und Blaubestrahlung "ausgebleichte" Fluoreszenz (s. auch Abb.9) wurde über Nacht regeneriert. Dieser Befund spricht für eine biochemische Regeneration des cornealen Fluorophorsystems.

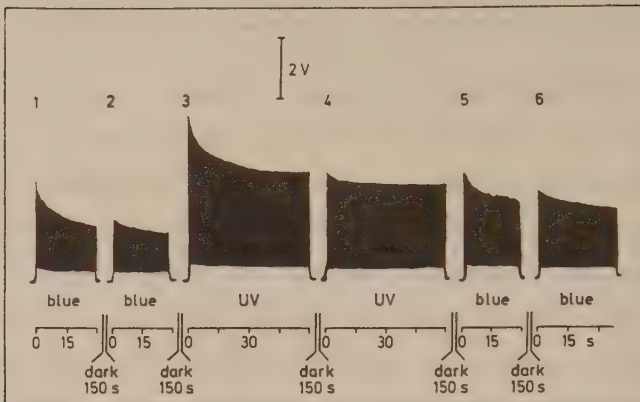


Abb.62

Kinetik der Fluoreszenz eines Fliegenauges in vivo (Mutante "Chalky"; Diät Herz; Meßwellenlänge 520nm) bei Blau- und UV-Anregung. Spur 1: Abnahme der Fluoreszenz des dunkeladaptierten Fliegenauges während Blauanregung. Spur 2: Weitere Abnahme der Fluoreszenz nach 150s Dunkelheit. Spur 3: Rückgang der Fluoreszenz während UV-Anregung nach 150s Dunkelheit. Spur 4: Weitere schwache Abnahme der Fluoreszenz nach 150s Dunkelpause. Spur 5: Abnahme der Fluoreszenz während Blauanregung nach 150s Dunkelheit. Spur 6: Weiterer Rückgang der Fluoreszenz nach 150s Dunkelheit. Beachte die vollständige Regeneration der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation. Beachte weiterhin die große Ähnlichkeit mit der Kinetik der isolierten Cornea der Fliege (s. Abb.33).

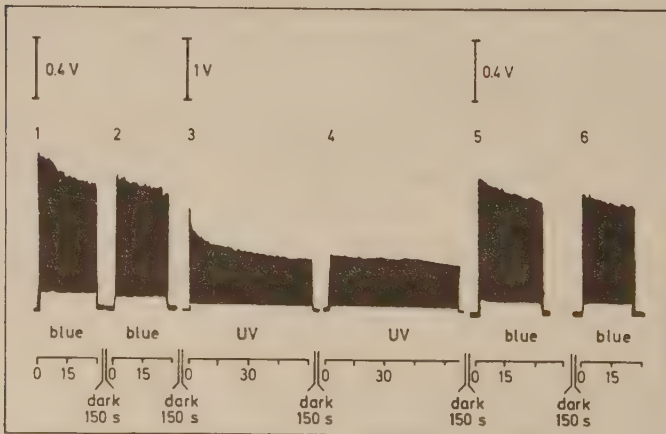


Abb.63

Kinetik der Fluoreszenz eines Fliegenauges in vivo (Wildtyp; Diät Herz; Meßwellenlänge 520nm) bei Blau- und UV-Anregung. Versuchsbedingungen wie in Abb.62. Beachte die große Ähnlichkeit mit der Kinetik der Mutante "Chalky" sowie die höhere Signalverstärkung.

### 3.10. Die Fluoreszenz von Ubichinonen in Phospholipidvesikeln

Ein den oben beschriebenen Fluorophorsystemen sehr ähnliches System konnte durch Einbau von Ubichinon (CoQ10) in Phospholipidvesikel synthetisiert werden. Da weder Ubichinon noch die Phospholipide allein in diesem Spektralbereich nennenswert absorbieren und fluoreszieren, muß dieses System durch Interaktion beider Komponenten entstehen.

#### 3.10.1. Photokinetik der Fluorophore

Wie in Abbildung 64, Spur 1 gezeigt, regte Blaustrahlung frisch hergestellte Vesikel nur schwach zur Fluoreszenz an, deren Intensität innerhalb von etwa 10s nur gering abnahm. Während anschließender UV-Belichtung nahm die Intensität der Fluoreszenz stetig zu (Spur 2), um nach etwa 10 Minuten einen

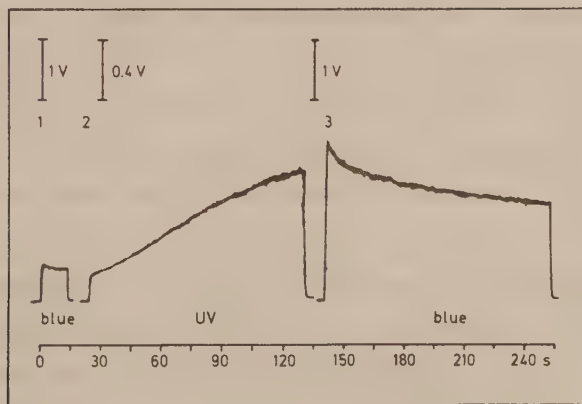


Abb.64

Kinetik der Fluoreszenz von Ubichinon-Phospholipidvesikeln (CoQ10 in PE/PC-Vesikeln) bei alternierender Blau- und UV-Anregung (Meßwellenlänge 520nm). Spur 1: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz während Blauanregung. Spur 2: Intensitätsanstieg der Fluoreszenz während UV-Anregung. Spur 3: Intensitätsabnahme der Fluoreszenz bei Blauanregung. Beachte die Vervielfachung der Intensität der blauangeregten Fluoreszenz nach UV-Adaptation. Beachte weiterhin die große Ähnlichkeit mit der Kinetik der Rhabdomere der Fliege (Abb.11a).

konstanten Maximalwert zu erreichen (letzteres nicht in der Abbildung dargestellt). Bei der nachfolgenden Blaubelichtung war die Intensität der initialen Fluoreszenz etwa vierfach höher als zu Beginn der ersten Blaubelichtung (Spur 3). Die Intensität der Fluoreszenz nahm innerhalb der ersten 10 Sekunden schneller, dann langsamer bis auf einen nach etwa 15 Minuten erreichten Endwert ab. Diese Modulationen konnten wie bei den natürlichen Systemen mehrfach wiederholt werden. Diese Kinetik spricht für ein System aus zwei Fluorophoren, die im UV bzw. im Blauen absorbieren und durch Licht ineinander überführbar sind.

### 3.10.2. Anregungsspektren des Fluorophorsystems

---

Die nachfolgenden Anregungs- und Emissionsspektren wurden von im Inneren alkalischen Vesikeln in alkalischem Milieu aufgenommen und zwar im unbelichteten Zustand und nach UV- bzw. Blaubelichtung. Das Anregungsspektrum unbelichteter Vesikel zeigte ein ausgeprägtes Maximum bei 380nm und eine schwache Hintergrundfluoreszenz im Bereich zwischen 400 und 500nm (Abb.65a, Kurve 1;  $\lambda_m = 568\text{nm}$ ). Nach UV-Belichtung stieg die Fluoreszenz in der Region zwischen 380 und 500nm beträchtlich an (Kurve 2), um dann nach Blaubelichtung wieder bis fast auf den Ausgangswert zurückzugehen (Kurve 3). Die korrespondierenden Differenzspektren (Abb.65b) geben näherungsweise die Absorptionseigenschaften des Fluorophors  $B_0$  wieder mit einem Absorptionsmaximum bei 440 nm.

Die Absorptionseigenschaften des im UV absorbierenden Fluorophors  $A_0$  ergeben sich aus den Anregungsspektren unbelichteter Vesikel gegen UV-belichtete (Abb.66a, b;  $\lambda_m = 490\text{nm}$ ).

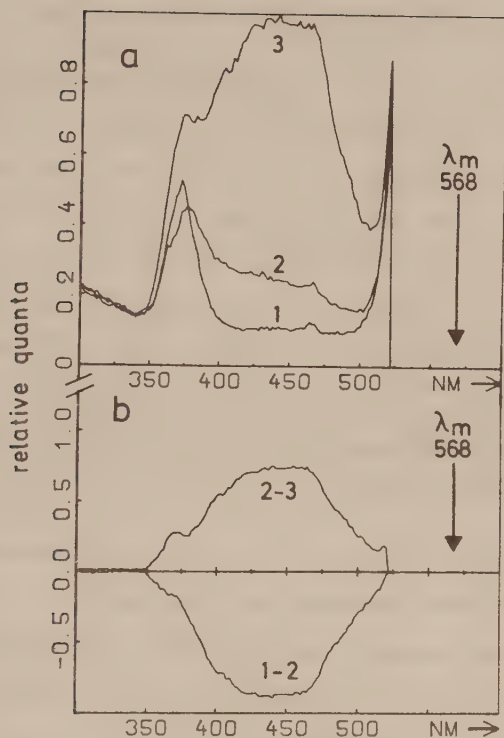


Abb.65

Änderung des Anregungsspektrums von Ubichinon-Phospholipid-vesikeln nach UV- und Blauadaptation. a. Originalspektren (Meßwellenlänge 568nm). Kurve 1: Dunkeladaptierte Vesikel. Kurve 2: Nach 6 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Nach anschließend 6 Minuten Blauadaptation. Beachte die fast vollständige Reversibilität. b. Differenzspektren gerechnet aus den in a. gezeigten Spektren. Beachte die maximale Modulation im Bereich von 430 bis 460nm. Diese Modulationen beschreiben die Bildung des Fluorophors  $B_0$  (1-2) und seinen Abbau (2-3).

Das Differenzspektrum zeigt die höhere Absorption des Fluorophors  $A_0$  im UV. Maximale Absorptionsdifferenz gegenüber  $B_0$  wurde bei etwa 380nm gefunden.

### 3.10.3. Emissionsspektren des Fluorophorsystems

---

UV-Adaptation bewirkte eine Verlagerung des Emissionsgipfels von etwa 450 auf 500nm (Abb.67,  $\lambda_0 = 380$ nm). Wie aus den Differenzspektren hervorgeht, werden mit 360nm vorwiegend der Fluorophor  $A_0$  (Abb.68, Kurve  $\lambda_0 360$ ), mit 400nm ausschließlich der Fluorophor  $B_0$  (Kurve  $\lambda_0 400$ ) und mit 380nm beide Fluorophore etwa gleich stark angeregt. Letzteres ist aus der etwa gleich großen Emissionsabnahme bei 440nm und Emissionszunahme bei 530nm zu folgern. Die Wellenlänge, bei der beide Fluorophore exakt gleich zur Fluoreszenz angeregt werden, dürfte nur wenig unterhalb 380nm liegen.

Die korrigierten Absorptions- und Emissionsspektren sind denen der Fliegenrhabdomere sehr ähnlich. Der Fluorophor  $A_0$  besitzt ein Anregungsmaximum bei 375nm und ein Emissionsmaximum bei 450nm. Das Anregungsmaximum des Fluorophors  $B_0$  liegt bei 445nm sein Emissionsmaximum um 560nm (Abb.69).

Bei Pilotexperimenten mit Coenzym Q6 und Plastochinon anstelle von CoQ10 wurde ein ähnliches Fluoreszenzverhalten gefunden; allerdings waren die Amplituden der Modulationen wesentlich geringer.

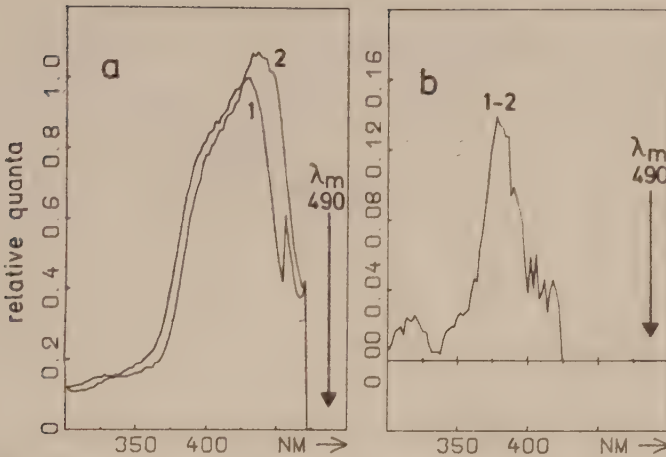


Abb. 66

Änderung des Anregungsspektrums von Ubichinon-Phospholipid-vesikeln nach UV-Adaptation. **a.** Originalspektren (Meßwellenlänge 490nm). **Kurve 1:** Dunkeladaptierte Vesikel. **Kurve 2:** Nach 6 Minuten UV-Adaptation. **b.** Differenzspektrum, gerechnet aus den in a. gezeigten Kurven. Beachte die maximale Modulation bei 375nm, die die maximale Absorptionsdifferenz von  $A_0$  gegenüber  $B_0$  im UV beschreibt.

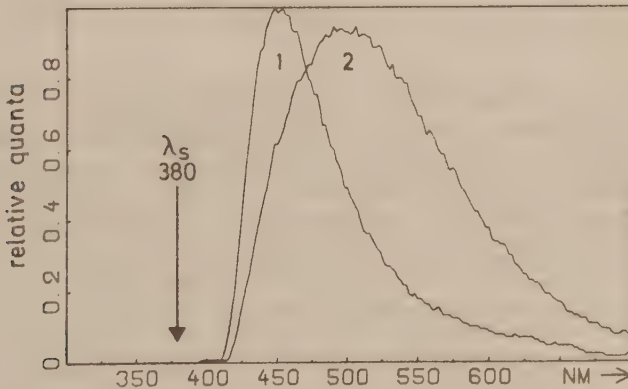


Abb. 67

Änderung des Emissionsspektrums von Ubichinon-Phospholipid-vesikeln nach UV-Adaptation (Anregungswellenlänge 380nm). **Kurve 1:** Dunkeladaptierte Vesikel. **Kurve 2:** Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Beachte die Verlagerung des Emissionsgipfels von etwa 450 auf 500nm.

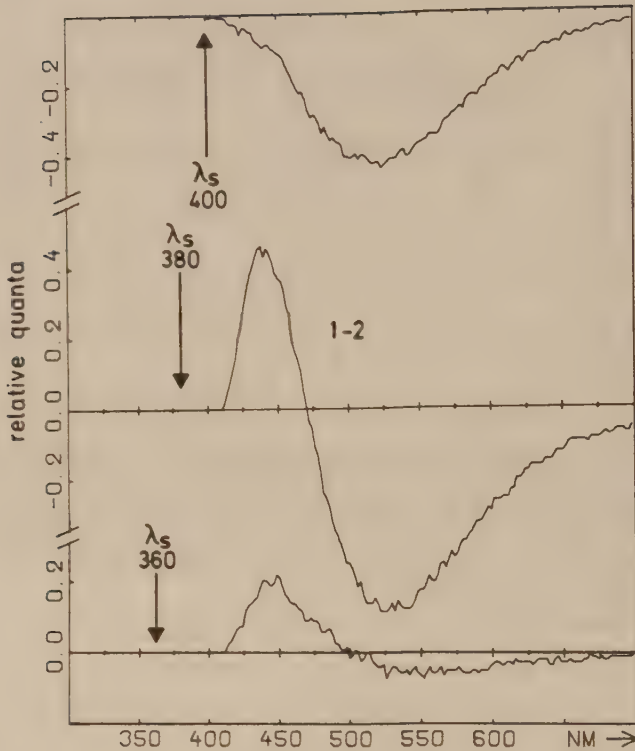


Abb.68

Abhängigkeit der Emissionsdifferenzspektren der Ubichinon-Phospholipidvesikel von der Anregungswellenlänge ( $\lambda_s = 360, 380$  und  $400$ nm). Alle Differenzspektren wurden von einem Vesikelaggregat nach UV-Adaptation (unbelichtete minus UV-adaptierte Vesikel) aufgenommen. Kurve  $\lambda_s 380$  ist die Differenz des in Abb.67 gezeigten Kurvenpaares. Anregung mit  $400$ nm führt zu einer maximalen Emissionsmodulation bei  $525$ nm. Anregung mit  $380$ nm führt zu einer Emissionsabnahme bei  $440$ nm, einer Emissionszunahme bei  $530$ nm und einem Isoemissionspunkt bei  $470$ nm. Anregung mit  $360$ nm bedingt fast ausschließlich eine Emissionsabnahme bei  $450$ nm. Spektrum  $\lambda_s 400$  gibt annähernd das invertierte Emissionsspektrum des Fluorophors  $B_0$ , Spektrum  $\lambda_s 360$  das des Fluorophors  $A_0$  wieder. Beachte, daß die Vesikel im Inneren alkalisch sind und sich in alkalischem Milieu befinden (vergl. Abb.70).

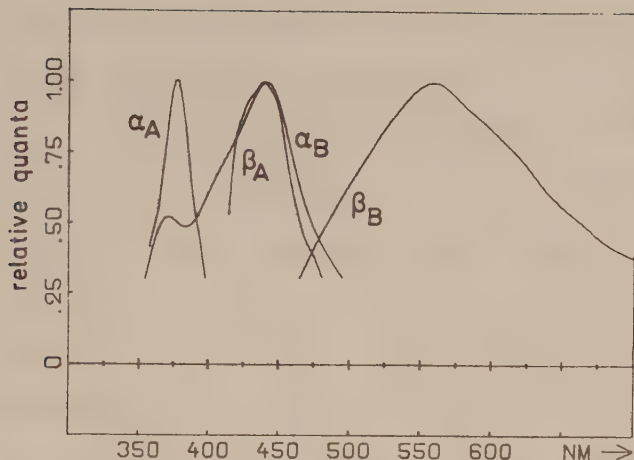


Abb. 69

Korrigierte Anregungs- und Emissionsspektren des photoreversiblen Fluorophorsystems der Ubichinon-Phospholipidvesikel. Die Spektren beruhen auf einem primären Farbstoff  $A_0$  mit maximaler Absorption bei 375nm und maximaler Emission bei 450nm und einem sekundären Farbstoff  $B_0$  mit maximaler Absorption bei 445nm und maximaler Emission bei 560nm. Die Spektren wurden aus in den Abbildungen 65, 66 und 68 gezeigten Rohspektren gewonnen, auf Eins normiert und leicht geglättet.

### 3.10.3. Der Einfluß von pH-Gradienten auf die Fluoreszenz von ----- Vesikeln -----

Wie in Abbildung 70 gezeigt, beeinflussen über die Vesikelmembran aufgebaute pH-Gradienten die Fluoreszenzeigenschaften der Vesikelaggregate nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ. Diese Gradienten-Abhängigkeit wurde mit Hilfe von Emissionsspektren ( $\lambda_e = 380\text{nm}$ ) analysiert. Wie aus dem Vergleich der Emissionsspektren von Zeile 1 und 2 hervorgeht, bewirkt UV-Belichtung bei Vesikeln mit einem Gradienten - innen sauer, außen alkalisch - starke Zunahme der Fluoreszenz, während sie bei Vesikeln mit umgekehrtem Gradienten - innen alkalisch, außen sauer - das Gegenteil nämlich starke Abnahme hervorruft. Weiterhin wird bei dem ersten Gradienten durch

UV ein Fluorophor mit einem Emissionsmaximum um 500nm gebildet, während bei dem zweiten Gradienten ein Fluorophor abgebaut wird, dessen Emissionspeak bei etwa 460nm liegt. Nachfolgende alternierende Blau- und UV-Belichtungen verursachen beim ersten Gradienten fast ausschließlich Modulationen bei 530nm, beim zweiten Gradienten hingegen bei 460nm. Die Amplituden sind dabei wesentlich geringer, ca. ein Drittel.

Aus Zeile 3 geht hervor, daß UV-Belichtung bei innen sauren Vesikeln in saurem Milieu, ebenso wie bei innen sauren, außen alkalischen Vesikeln, eine Zunahme der Fluoreszenz bei 500nm bewirkt. Diese ist allerdings etwa vierfach geringer. Anschließend abwechselnde Blau- und UV-Belichtungen rufen hier sowohl eine Fluoreszenzmodulation bei 460nm als auch bei 530nm hervor. Diese Modulationen sind mit denen von innen und außen alkalischen Vesikeln vergleichbar (s. Abb. 68,  $\lambda$  380).

Sowohl bei Verwendung von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  als auch von Glycin als alkalischen Puffer wurden identische Ergebnisse erzielt.

Für das Fluorophorsystem lassen sich aufgrund der Gradientenabhängigkeit folgende Aussagen machen:

1. Kurve 1 aus Abb. 65 (innen und außen alkalisch) repräsentiert voraussichtlich das primäre Absorptionsspektrum.
2. Das Emissionsspektrum dieses primären Fluorophors entspricht der Kurve 1 von Abb. 67.
3. Die Ausgangssituation für innen alkalische Vesikel in saurem Milieu ist identisch mit der innen und außen alkalischer Vesikel (s. Abb. 70). Erst durch Belichtung ergeben sich Unterschiede: Im Fall innen und außen alkalisch eine Verschiebung zur langwelligen Emission (Abb. 67); im Fall innen alkalisch-

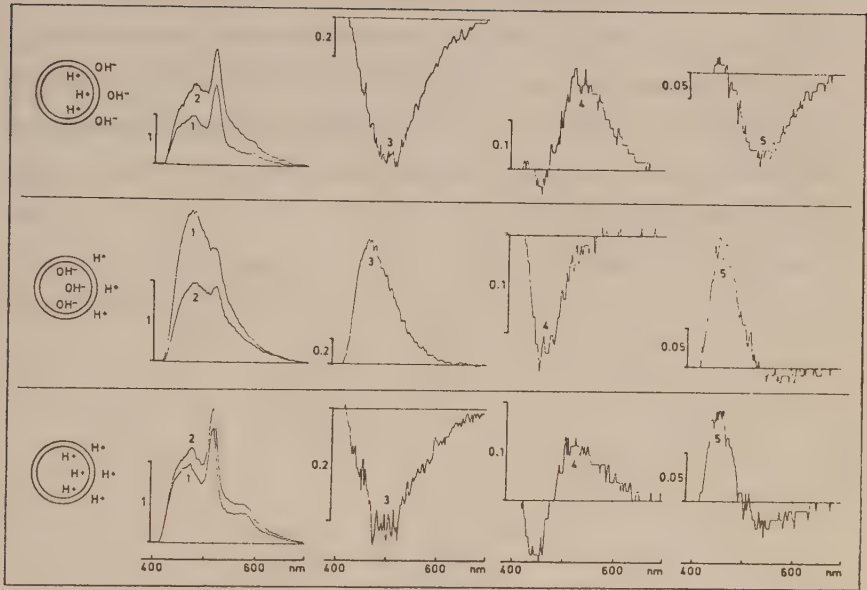


Abb.70

Einfluß von über die Membran der Ubichinon-Phospholipidvesikel aufgebauten Ionengradienten auf das Emissions- und Emissionsdifferenzspektrum (Anregungswellenlänge 380nm; 50mM Zitronensäure 50mM Glycin). Kurve 1: Unbelichtete Vesikel. Kurve 2: Nach 4 Minuten UV-Adaptation. Kurve 3: Differenzspektrum (Kurve 1 minus Kurve 2). Kurven 4 und 5: Gemittelte Differenzspektren aus jeweils fünf aufeinander folgenden gleichsinnigen Differenzen bei alternierenden UV- und Blauadaptation (Kurve 4: UV-adaptiert minus blauadaptiert; Kurve 5: blauadaptiert minus UV-adaptiert). Obere Reihe: Im Inneren saure Vesikel in alkalischem Umgebungsmilieu. Mittlere Reihe: Im Inneren alkalische Vesikel in saurem Umgebungsmilieu. Untere Reihe: Im Inneren saure Vesikel in saurem Umgebungsmilieu. Beachte die gegenläufige Modulation bei entgegengesetzten Ionengradienten. Während bei im Inneren sauren Vesikeln in alkalischem Milieu hauptsächlich der Fluorophor  $B_0$  moduliert, moduliert bei entgegengesetztem Ionengradienten hauptsächlich der Fluorophor  $A_0$ .

außen sauer eine Reduktion der Emission. Der Ionengradient wirkt sich also erst bei Belichtung auf die Farbstoffeigenschaften in diesen beiden Fällen aus.

4. Die Summe der beiden Farbstoffeffekte bei innen sauer - außen alkalisch und bei innen alkalisch - außen sauer liefert das Verhalten von innen und außen alkalischen Vesikeln (Abb. 71). Dies spricht dafür, daß bei Fehlen eines Gradienten beide molekularen Farbstoffeigenschaften etwa gleich häufig in der Vesikelmembran vorkommen.

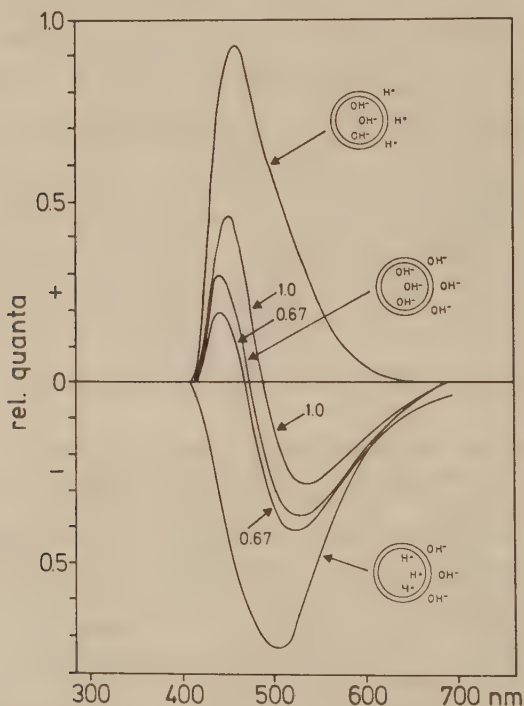


Abb. 71

Simulation des Emissionsdifferenzspektrums (unbelichtet minus UV-adaptiert) von alkalischen Vesikeln in alkalischem Milieu durch Differenzbildung der Spektren von sauren Vesikeln in alkalischem und alkalischen Vesikeln in saurem Milieu (aus Abb. 70, obere und mittlere Reihe, Kurve 2). Bei der Kurve 1.0 wurden die empirischen Spektren direkt, bei Kurve 0.67 die Amplituden im Verhältnis 2:3 subtrahiert. Die empirische Funktion alkalischer Vesikel in alkalischem Milieu aus Abb. 68  $\lambda_{380}$  wird durch die beiden gerechneten Spektren eingeschlossen.

### 3.10.5. Injektion von Ubichinon in Fliegenaugen

Zwei Tage nach der Injektion von Ubichinon in jeweils ein Auge einer auf Herzfleisch angezogenen Fliege wurden von beiden Augen Rhabdomerpräparate hergestellt und deren Anregungsspektren vor und nach UV-Belichtung aufgenommen. Bei der verwendeten Meßwellenlänge (568nm) wurde die UV-induzierte Zunahme des Fluorophors  $B_R$  erfaßt. Wie aus Abbildung 71 ersichtlich, nahm die Fluoreszenz von  $B_R$  nach UV-Belichtung mit der injizierten Ubichinonmenge zu. Wie die Kontrollmessungen an den Rhabdomeren der nichtinjizierten Augen zeigen, blieb bei die-

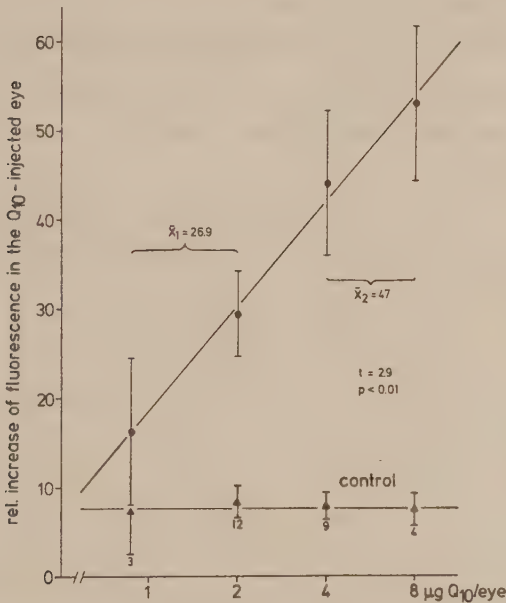


Abb. 72

Durch Injektion von Ubichinon bedingter Modulationsanstieg des Fluorophors  $B_R$  der Fliegenrhabdomere (Diät Herz) nach UV-Adaptation. Jeweils zwei Tage nach Injektion von Ubichinon in ein Auge wurde der UV-induzierte Anstieg an Rhabdomeren des injizierten und nichtinjizierten Auges (control) bestimmt (Meßwellenlänge 568nm). Der Mittelwert bei Injektion von 1 bis 2 µg Q10/eye ist nach dem t-Test gegen den bei Injektion von 4 bis 8 µg Q10/eye sehr gut abgesichert ( $p < 0.01$ ).

sen der UV-induzierte Fluoreszenzanstieg konstant niedrig. Hieraus folgt, daß Ubichinon nur in die Rhabdomere der injizierten Augen eingebaut wird. Schon die Injektion von 2 µg Ubichinon in Augen von auf Herzfleisch angezogenen Fliegen bewirkt eine Fluoreszenzmodulation der Rhabdomere, die mit der von auf Mangeldiät II angezogenen Fliegen vergleichbar ist. Dieser UV-induzierte Fluoreszenzanstieg ist mindestens zu 50% durch Blauadaptation reversibel.

### 3.11. Zusammenfassung der Anregungs- und Emissionsmaxima der ----- untersuchten Fluorophorsysteme -----

Die untersuchten Fluorophorsysteme bestehen jeweils aus einem im UV-Bereich und einem im Blauen dominant absorbierenden Fluorophor. Durch UV- bzw. Blauadaptation lassen sich diese ineinander überführen. Ein dem in den untersuchten natürlichen Strukturen sehr ähnliches System ließ sich durch Einbau von

|                | $\alpha_{A_{max}}$<br>(nm) | $\beta_{A_{max}}$<br>(nm) | $\alpha_{B_{max}}$<br>(nm) | $\beta_{B_{max}}$<br>(nm) | $\alpha_{C_{max}}$<br>(nm) | $\beta_{C_{max}}$<br>(nm) |
|----------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Calliphora     |                            |                           |                            |                           |                            |                           |
| Rezeptoren     | 370                        | 460                       | 440                        | 550                       | -                          | -                         |
| Semperzellen   | 370                        | 470                       | 445                        | 540                       | -                          | -                         |
| Cornea         | 380                        | 460                       | 380                        | 460                       | -                          | -                         |
|                |                            |                           | 470                        |                           |                            |                           |
| Deilephila     |                            |                           |                            |                           |                            |                           |
| Rezeptoren     | 380                        | 450                       | 440                        | 540                       | -                          | -                         |
| Semperzellen   | 380                        | 475                       | 380                        | 475                       | 400                        | 475                       |
|                |                            |                           | 470                        |                           |                            |                           |
| Cornea         | 380                        | 460                       | 380                        | 550                       | -                          | -                         |
|                |                            |                           | 470                        |                           |                            |                           |
| Ascalaphus     |                            |                           |                            |                           |                            |                           |
| Semperzellen   | 370                        | 450                       | 430                        | 550                       |                            |                           |
| Q10-PL-Vesikel | 375                        | 440                       | 445                        | 560                       |                            |                           |

Tabelle 4

-----  
Anregungs- und Emissionsmaxima der Untersuchten Fluorophorsysteme.

Ubichinon in Phospholipidvesikel herstellen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind in Tabelle 4 alle Anregungs- und Emissionsmaxima zusammengefaßt.

Die Fluorophorsysteme sind vollständig (Rhabdomere, Semperzellen von *Calliphora* und *Ascalaphus*), partiell (Semperzellen von *Deilephila*) bzw. fast gar nicht photoreversibel (*Cornea*).

#### 4. Diskussion

---

##### 4.1. Vorkommen der untersuchten Fluorophorsysteme

---

Verschiedene Fluorophorsysteme wurden in den Photorezeptoren von Calliphora und Deilephila, den Semperzellen von Calliphora, Deilephila und Ascalaphus sowie in der Cornea von Calliphora und Deilephila nachgewiesen. Die detailliertesten Informationen konnten über das Fluorophorsystem in den Rhabdomeren der Fliege gewonnen werden.

Schon die mikroskopische Betrachtung isolierter Rhabdome zeigte eindeutig, daß die Fluoreszenz von den Rhabdomeren herührt (Abb.10). Ob die Fluorophore in den Mikrovilli selbst oder im anliegenden endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, konnte jedoch bisher nicht entschieden werden, da die hoch lichtbrechenden Mikrovilli durch benachbarte fluoreszierende Strukturen zum Aufleuchten gebracht werden können. Die inverse Beziehung zwischen Fluoreszenzanstieg nach UV-Adaptation und Rhodopsingehalt (Tabelle 3) spricht allerdings dafür, daß das Fluorophorsystem direkt an die Mikrovilli gekoppelt ist und nicht an benachbarte Membrankompartimente. Untersuchungen an Photorezeptoren von Deilephila erbrachten hierzu keinen weiteren Aufschluß.

Eine genaue Lokalisierung des Fluorophorsystems in den Semperzellen war mit dem vorhandenen Meßsystem ebenfalls nicht möglich. Die Semperzellen der Fliege zeichnen sich jedoch gegenüber den Rezeptoren durch einen hohen Gehalt an endoplasmatischem Retikulum, an tubulären Strukturen und durch eine wesentlich geringere Anzahl von Mitochondrien aus (Walz, 1983). Es ist daher gut begründet anzunehmen, daß das Fluorophorsy-

stem dieser Zellen entweder mit dem endoplasmatischen Retikulum oder den tubulären Strukturen assoziiert ist.

Die corneale Fluoreszenz stammt, wie seitlich belichtete Corneaschnitte zeigen, hauptsächlich aus dem Inneren der Cornealinsen. Wie in Abb.51 gezeigt, fluoreszieren bei Deilephila die molekularen Schichten, die die Zonen unterschiedlicher Brechungsindices trennen.

#### 4.2. Reaktionsschemata der photoreversiblen Fluorophorsysteme

Wie in Tabelle 4 gezeigt, unterscheiden sich die Absorptions- und Emissionsmaxima der UV- bzw. blauabsorbierenden Fluorophore nur geringfügig voneinander. Die Fluorophorsysteme der Cornea sind allerdings im Gegensatz zu den Fluorophorsystemen der Photorezeptoren und Semperzellen weit geringer photoreversibel. Zumindest die letzteren Fluorophorsysteme von Photorezeptoren und Semperzellen der Fliege und von Ascalaphus sind in ihren Absorptions- und Emissionseigenschaften so ähnlich, daß anzunehmen ist, daß sie der gleichen Stoffgruppe angehören, und daß die geringen Differenzen möglicherweise durch geringe Unterschiede in der chemischen Struktur hervorgerufen werden.

Die Fluoreszenzkinetiken aller Fluorophorsysteme sind ähnlich und meist durch einfache Exponentialfunktionen approximierbar. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Amplitude der nach UV-Adaptation induzierten Fluoreszenzzunahme des blauabsorbierenden Fluorophors. Ausnahme hiervon ist die Fluoreszenzkinetik der Rhabdomere von auf Mangeldiät II angezogenen Fliegen. Bei diesen wurden während UV-Anregung regelmäßig diphasische Kinetiken beobachtet; mit zunächst

schnellem Abfall, Durchlaufen eines Minimums, gefolgt von einem erneuten Anstieg. Dieser Fluoreszenzverlauf spricht für das Auftreten eines nicht oder nur gering fluoreszierenden Zwischenprodukts beim lichtinduzierten Übergang des Fluorophors  $A_R$  nach  $B_R$ . Bei hoher Trefferzahl und somit schnellem Abbau von  $A_R$  sollte es zur zwischenzeitlichen Anhäufung des nichtfluoreszierenden Zwischenprodukts  $Z_1$  kommen, das dann relativ langsam in einer thermischen Reaktion in das hochfluoreszente Endprodukt  $B_R$  übergeht. Die Hypothese der Existenz eines derartigen Zwischenprodukts wird weiter durch den Befund gestützt, daß die Fluoreszenz nach der UV-Adaptation weiter bis zu einem Maximalwert ansteigt; vermutlich bis zur völligen thermischen Umwandlung des Zwischenprodukts in  $B_R$ . Diese Dunkelreaktion ist, wie im in Abb.21 dargestellten Experiment gezeigt, temperaturabhängig. Der mit 1.7 errechnete  $Q_{10}$  für einen Temperatursprung von  $15^{\circ}\text{C}$  auf  $25^{\circ}\text{C}$  liegt im Bereich vieler biochemischer Reaktionen. Die primäre photochemische Reaktion von  $A_R$  in den "Leukozustand"  $Z_1$  ist sehr wahrscheinlich eine Einquantenreaktion, da das I\*t-Gesetz über einen größeren Intensitätsbereich hin gilt (Abb.20): denn bei einer zwei- oder mehrfach Quantenreaktion ist bei geringerer Intensität die Wahrscheinlichkeit, daß ein Molekül in einem kurzlebigen angeregten Zustand ein zweites Quant absorbiert, wesentlich niedriger als bei hoher Intensität. Auch für die Rückreaktion  $B_R$  nach  $A_R$  wurde gezeigt, daß sich der photochemischen Reaktion eine thermische Dunkelreaktion anschließt (Abb.19), und daß auch die photochemische Rückreaktion weitgehend dem I\*t Gesetz folgt (s.Tabelle 2). Die Fluoreszenz in den Rhabdomeren der Fliege ist stark pH-abhängig (Abb.22). Größte Modulationen des Fluorophors  $B_R$  wurden bei pH-Werten  $< 5.5$ , geringste bei

pH-Werten  $> 7.7$  und mittlere bei einem pK-Wert von 6.3 gefunden. Diese mit dem pH korrelierte Modulation läßt sich sehr gut durch eine theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten von 2 beschreiben. Hieraus folgt, daß die Aufnahme zweier Protonen durch das Zwischenprodukt  $Z_1$  zur Bildung des Fluorophors  $B_R$  notwendig ist. Die Lage des pK-Punktes sowie der Bedarf von zwei Protonen weisen auf ein photosensitives Redoxsystem hin, welches sich ähnlich wie bekannte Redoxsysteme verhält.

Das Reaktionsschema dieses photoreversiblen Fluorophorsystems ist in Abb.73a dargestellt. Das Schema basiert auf der Annahme, daß  $A_R$  bei Quantenabsorption in einen angeregten Zustand  $A_R^*$  übergeht, welcher entweder unter Quantenemission um 450nm in den Grundzustand  $A_R$  relaxiert oder in das Zwischenprodukt  $Z_1$  übergeht. Letzteres wandelt sich durch Aufnahme zweier Protonen in  $B_R$  um. Quantenabsorption durch  $B_R$  führt zu einem angeregten Zustand  $B_R^*$ , der entweder unter Quantenemission bei 530nm nach  $B_R$  relaxiert oder in das Zwischenprodukt  $Z_2$  übergeht, welches sich unter Protonenabgabe in  $A_R$  umwandelt.

Für die Fluorophorsysteme der Photorezeptoren von *Deilephila* sowie der Semperzellen von *Calliphora* und *Deilephila* scheint das gleiche Reaktionschema zu gelten, obwohl Anregungs- und Emissionsmaxima geringfügig divergieren.

Wie mit der in Abb.7 gezeigten Computersimulation demonstriert, genügt bereits eine geringe Änderung der Geschwindigkeitskonstanten der Dunkelreaktion, daß statt einer diphasischen eine monophasische Kinetik während UV-Belichtung auftritt. Eine thermische Reaktion kann deshalb verdeckt aber

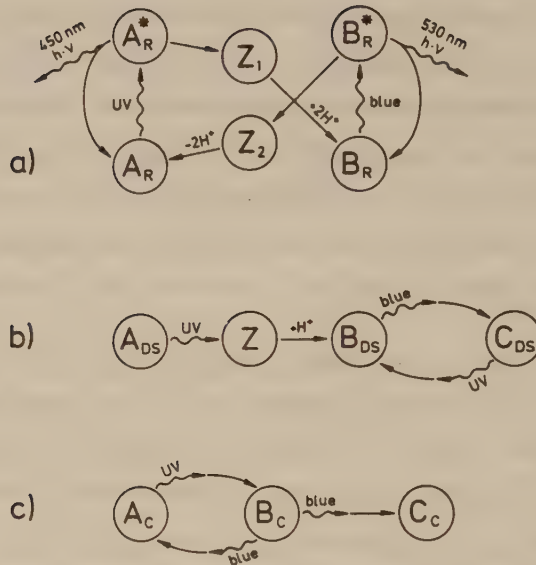


Abb. 73

Reaktionsschemata der Fluorophorsysteme der Rhabdomere und der Semperzellen von *Calliphora* und *Ascalaphus* (a), der Semperzellen von *Deilephila* (b) sowie der Cornea (c). a. Der Fluorophor  $A_R$  wird durch Quantenabsorption in einen angeregten Zustand  $A_R^*$  angehoben, welcher entweder unter Quantenemission in den Grundzustand zurückfällt oder in das Zwischenprodukt  $Z_1$  übergeht. Letzteres wandelt sich unter Aufnahme zweier Protonen in den Fluorophor  $B_R$  um. Quantenabsorption durch  $B_R$  führt zu einem angeregten Zustand  $B_R^*$ , der entweder unter Quantenemission nach  $B_R$  zurückfällt oder in das Zwischenprodukt  $Z_2$  übergeht, das sich unter Protonenabgabe in  $A_R$  umwandelt. b. Quantenemission hebt den Fluorophor  $A_{DS}$  in den angeregten Zustand  $A_{DS}^*$  an, der entweder unter Quantenemission nach  $A_{DS}$  zurückfällt oder über das Zwischenprodukt  $Z$  thermisch unter Aufnahme eines Protons nach  $B_{DS}$  übergeht. Quantenabsorption durch  $B_{DS}$  führt zu  $B_{DS}^*$ , der entweder unter Quantenemission nach  $B_{DS}$  zurückfällt oder in den sekundären Folgefluorophor  $C_{DS}$  übergeht.  $C_{DS}$  wird nach Quantenemission in  $C_{DS}^*$  angehoben, welcher entweder unter Quantenemission in  $C_{DS}$  zurück- oder nach  $B_{DS}$  übergeht. c. Der primäre Fluorophor  $A_C$  geht nach Quantenabsorption in den angeregten Zustand  $A_C^*$  über, welcher entweder unter Quantenemission nach  $A_C$  zurückfällt oder thermisch nach  $B_C$  übergeht. Dieser wird nach Quantenabsorption in  $B_C^*$  angehoben, der entweder unter Quantenemission in den Grundzustand zurückfällt oder alternativ in  $A_C$  oder das schwach oder nicht fluoreszierende Endprodukt  $C_C$  übergeht.

dennoch vorhanden sein. Hinweise auf die Existenz thermischer Dunkelreaktionen und somit von Zwischenprodukten ergeben sich aus den in den Abbildungen 23, 24 und 38 gezeigten Experimenten. Bei allen Experimenten nahm nach UV- bzw. Blauadaptation die Fluoreszenz der Fluorophore B und A noch im Dunkeln zu, ähnlich wie beim Fluorophor  $B_R$  der Fliege.

Von den Semperzellen von *Ascalaphus* konnten wegen des zeitlich begrenzt vorhandenen Tiermaterials keine Fluoreszenzkinetiken aufgenommen werden. Die den oben besprochenen Anregungs- und Emissionsspektren sehr ähnlichen Spektren sowie deren vollständige Reversibilität sprechen dafür, daß auch hier das oben vorgestellte Reaktionsschema gilt.

Die Reaktionsschemata der Fluorophorsysteme der Semperzellen von *Deilephila* und der Corneae von *Calliphora* und *Deilephila* unterscheiden sich von dem oben vorgeschlagenen.

In den Semperzellen von *Deilephila* kommen zwei Fluorophore vor (Abb. 73b), deren Absorptionseigenschaften einander sehr ähnlich sind. Der primäre Fluorophor  $A_{DS}$  zeigt im UV maximale Absorptionsdifferenz um 350nm gegenüber dem Fluorophor  $B_{DS}$ , welcher wiederum maximale Absorptionsdifferenz gegenüber  $A_{DS}$  um 470nm aufweist. Die Emissionseigenschaften sind ebenfalls sehr ähnlich.  $B_{DS}$  zeigt maximale Emissionsdifferenz gegenüber  $A_{DS}$  um 550nm (Plus-Minus-Modulation). Quantenabsorption im UV durch  $A_{DS}$  bewirkt eine Anhebung in einen angeregten Zustand  $A_{DS}^*$ , der entweder unter Quantenemission um 475nm in den Grundzustand  $A_{DS}$  zurückfällt oder über ein Zwischenprodukt  $Z_1$  thermisch nach  $B_{DS}$  übergeht. Quantenabsorption durch  $B_{DS}$  führt ebenfalls zu einem angeregten Zustand  $B_{DS}^*$ , der entweder unter Quantenemission um 475nm in den Grund-

zustand zurückfällt, oder in einen sekundären Folgefluorophor  $C_{DS}$  übergeht, der ebenfalls ein Emissionsmaximum um 400nm hat. Letzterer Übergang ist photoreversibel. Quantenabsorption durch  $C_{DS}$  führt zu einem angeregten Zustand  $C_{DS}^{\dagger}$ , der entweder unter Quantenemission um 475nm in den Grundzustand  $C_{DS}$  zurückfällt oder nach  $B_{DS}$  übergeht.

Der Photoübergang von  $A_{DS}$  nach  $B_{DS}$  ist ebenfalls stark pH-abhängig. Die mit dem pH korrelierte Modulation läßt sich hier jedoch besser durch eine theoretische Funktion mit einem Hillkoeffizienten von 1 beschreiben (Abb.50). Hieraus folgt, daß hier möglicherweise die Aufnahme nur eines Protons durch das Zwischenprodukt  $Z_1$  zur Bildung von  $B_{DS}$  ausreicht.

In den Corneae liegt ein primärer Fluorophor  $A_C$  mit sehr ähnlichen Absorptions- und Emissionseigenschaften wie sein Folgefluorophor  $B_C$  vor. Letzterer weist maximale Absorptionsdifferenz gegenüber  $A_C$  bei 470nm auf. Quantenabsorption durch  $A_C$  im UV führt zu einem angeregten Zustand  $A_C^{\dagger}$ , der entweder unter Quantenemission um 450nm in den Grundzustand zurückfällt oder über ein Zwischenprodukt thermisch in  $B_C$  übergeht. Quantenemission durch  $B_C$  führt zu einem angeregten Zustand  $B_C^{\dagger}$ , der entweder unter Quantenemission um 450nm in den Grundzustand  $B_C$  relaxiert, oder alternativ in  $A_C$  oder ein schwach oder nicht fluoreszierendes Endprodukt  $C_C$  übergeht (Abb.73c). Hierdurch wäre die nur geringe Reversibilität dieses Fluorophorsystems erklärbar. Da, wie im in vivo Experiment gezeigt, die corneale Fluoreszenz über Nacht regeneriert, ist hier eine biochemische Regeneration anzunehmen.

Die ähnlichen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der primären Fluorophore und ihrer Photoprodukte sprechen

dafür, daß es sich hierbei um die gleiche Gruppe von Naturstoffen handelt, die aufgrund ihrer Ankopplung an verschiedene Zellstrukturen ihre photochemischen Eigenschaften modulieren.

#### 4.3. Mögliche chemische Natur der Fluorophore

Die inverse Beziehung zwischen Rhodopsingehalt und Fluoreszenzanstieg schließt Retinal-Retinol-Farbstoffe wie Rhodopsin als Kandidaten für das Fluorophorsystem aus. Auch die "sensitizing pigments", die als photostabile, UV-absorbierende Farbstoffe Quantenenergie auf die Sehfärbstoffe übertragen (Vogt und Kirschfeld, 1983; Kirschfeld, 1986), wurden als Vitamin-A-Derivate (3-Hydroxyretinol bei den Muscoiden und Retinol bei den Simuliiden; Vogt und Kirschfeld, 1984; Kirschfeld und Vogt, 1986) identifiziert und kommen somit nicht in Betracht.

Stavenga und Tinbergen (1983) und Tinbergen und Stavenga (1986, 1987) haben gezeigt, daß Fluoreszenzänderungen in den intakten Komplexaugen der Fliege von Redoxreaktionen der Farbstoffe der Atmungskette herrühren. Die unter  $O_2$ - und  $N_2$ -Atmosphäre aufgenommenen Absorptionsdifferenzspektren sind denen von Mitochondrien des Rattenhirns (Piantadosi und Jöbsis-Vandervliet 1984) sehr ähnlich und daher sicherlich auf Farbumschläge in der Atmungskette zurückzuführen. Es ist jedoch nicht ganz auszuschließen, daß bei antidromer Durchstrahlung der Fliegenköpfe die Absorptionsspektren der Mitochondrien des Zentralnervensystems mit in die spektrale Modulation bei hypoxischer und anoxischer Bedingung eingehen. Der Anteil der bei orthodromer Bestrahlung durch UV angeregten Fluoreszenz, der an Redoxreaktionen von NADH und Flavoproteinen erinnert und somit direkt auf lichtinduzierten Änderungen der Stoff-

wechselaktivität der Photorezeptoren beruht, beträgt jedoch nur etwa 15% der von diesen Autoren gemessenen Gesamtfluoreszenz. Nach den vorliegenden Untersuchungen rührt der größte Teil der Fluoreszenz des Insektenauges von anderen Strukturen her, so von den isolierten Rhabdomeren, von isolierten Semperzellen, die nur relativ wenig Mitochondrien besitzen und von den Cornealinsen. Bei diesen Organellen waren keine spezifischen Fluoreszenzänderungen in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck zu beobachten, wie es für die oben genannten Redoxsysteme zu fordern ist. Zumindest die neubeschriebenen photo-reversiblen Redoxsysteme der Rhabdomere und der Cornea können nicht an Mitochondrien gebunden sein, sondern sind viel wahrscheinlicher an andere membranöse Zellorganelle oder an das Cytoskelett gekoppelt.

Es ist zu diskutieren, welche anderen bekannten Redoxsysteme für die beobachteten Phänomene in Betracht kommen könnten. Hier sind vorrangig folgende Stoffgruppen zu nennen: Cytochrome, Pyridinnukleotide, Flavine, Pteridine, Ommochrome, Katecholamine und membrangebundene Chinone. Einige charakteristische UV-Spektren aus diesen Stoffgruppen, die im gleichen Spektralbereich wie die Fluorophorsysteme liegen, sind in Abbildung 74 wiedergegeben.

Cytochrome sind mit wenigen Ausnahmen an die Mitochondrien gebunden und fluoreszieren in der Regel nur gering (Angiolillo et al., 1982). Stärkere Fluoreszenz wurde bisher nur für Cytochrom c nach Extraktion des Häm eisens ( $\lambda_{max} = 620\text{nm}$ ; Vanderkooi et al., 1985) nachgewiesen. Alle bekannten Cytochrome zeigen zwischen der reduzierten und oxidierten Form Modulation in Lage und Amplitude der Gamma-Bande im Bereich

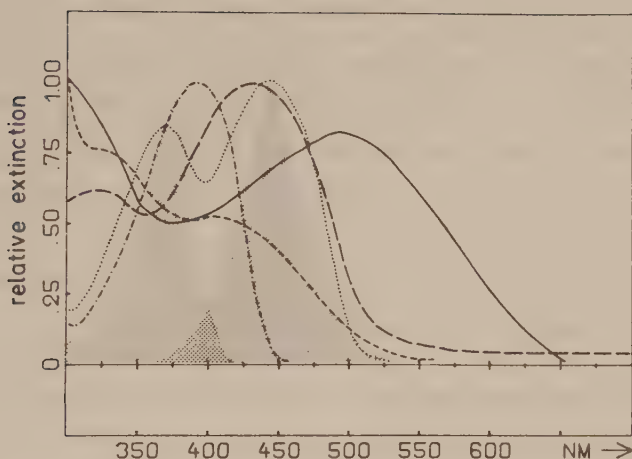


Abb.74

Einige charakteristische UV-Extinktionsspektren von Farbstoffen, die als Kandidaten für das Fluorophorsystem in Frage kommen (Extinktionsmaxima normiert auf Eins) im Vergleich mit den Anregungsspektren der Fluorophore des Fliegenrhabdomers.

— Adrenochrom (200  $\mu\text{M}$ ; in  $\text{H}_2\text{O}$ ); ---- Ubichinon (500 mM; in Chloroform-Methanol); — Bilirubin (100  $\mu\text{M}$ ; in 0.1n NaOH); ..... Lumiflavin (20  $\mu\text{M}$ ; in  $\text{H}_2\text{O}$ ); — · — · Xanthopterin (100  $\mu\text{M}$ ; in 0.1n NaOH).

zwischen 390 und 400nm. Stets kommt es bei der oxidierten Form zu einer kurzwelligen Verschiebung; so z.B. Cytochrom c vom Säugerherzmuskel von 415 nach 409nm, für Cytochrom b von 429 nach 415nm. Größere Spektralsprünge wurden bei Cytochrom c in photosynthetisch aktiven Bakterien nachgewiesen, so z.B. für *Rhodospirillum rubrum* von 432 nach 390nm. Die Spektren der Cytochrome der Fliege sind nicht bekannt; eine extreme Modulation zwischen reduzierter und oxidierten Form wie bei *R. rubrum* wäre erforderlich, um die Fluoreszenzeffekte im Fliegenauge zu erklären.

Die Pyridinnukleotide NAD und NADP ( $\lambda_{\text{max}}$  um 260nm) bilden im reduzierten Zustand ( $\text{NADH}_2$ ,  $\text{NADPH}_2$ ) ein zweites Absorptionsmaximum um 340nm aus. Diese reduzierten Pyridinnukleo-

tide fluoreszieren im Gegensatz zur oxidierten Form mit einem Emissionsmaximum bei 470nm (Scholz et al., 1969). Das Emissionsmaximum proteingebundener Pyridinnukleotide liegt bei 440nm (Scholz et al., 1969, Fraikin et al., 1985). Photoreaktionen, durch die die Anregungs- und Emissionsspektren proteingebundener Pyridinnukleotide ähnlich variiert werden wie bei den untersuchten Fluorophoren, sind nicht bekannt. Freie Pyridinnukleotide kommen somit aufgrund ihrer reinen UV-Absorptionseigenschaften kaum in Betracht.

Im Gegensatz zu den Pyridinnukleotiden fluoreszieren die Flavine nur in der oxidierten Form, und zwar gelblich (Scholz et al., 1969). Freies FAD, FMN und Riboflavin haben in wäßriger Lösung ein typisches Emissionsmaximum bei 520nm (Ghisla et al., 1974). Obwohl isolierte Flavoproteine in der Regel nicht fluoreszieren, ist die bei Mitochondrien beobachtete Fluoreszenzmodulation (Emissionsmaximum 570nm) eng mit den Absorptionsänderungen der Flavoproteine korreliert (Scholz et al., 1969). Bereits Chance und Schoener (1966) zeigten, daß die gelb-grüne Fluoreszenz der Mitochondrien des Taubenherzens von Flavinen und Flavoproteinen ausgeht, wobei die Flavoproteine nur im oxidierten Zustand fluoreszieren (Ghisla et al., 1974). Für oxidiertes  $\alpha$ -Lipoamid-Dehydrogenase-Flavin aus Mitochondrien der Rattenleber wurden z.B. Maxima für Anregung und Emission von 480nm bzw. 545nm angegeben (Kunz, 1986) und für oxidiertes Elektronentransfer-Flavoprotein aus Mitochondrien der Schweineleber ein Emissionsmaximum bei 495nm (Hall und Kamin, 1976). Vergleichbare Modulationen von Anregungs- und Emissionsspektren, verursacht durch Photoreaktionen, wie sie bei den untersuchten Fluorophorsystemen vorliegen, wurden bisher bei Flavinen und Flavoproteinen nicht gezeigt. Daher

kommen auch Flavine und Flavoproteine als alleinige Kandidaten kaum in Betracht. Ein gekoppeltes System jedoch aus im UV absorbierenden Pyridinnukleotiden und im Blauen absorbierenden Flavinen bzw. Flavoproteinen könnte die experimentell gefundenen Eigenschaften hervorrufen.

Als weitere mögliche Kandidaten sind die fluoreszierenden Pteridine, die als Farbstoffe bei Insekten weit verbreitet sind, zu nennen. Die Emissionsmaxima der Pteridine liegen in verschiedenen Spektralbereichen, so im Blauen beim Pterin, im Grünen beim Urothion und im Gelben beim Lepidopterin. Die häufigsten Emissionsmaxima der Pteridine liegen im blauen Spektralbereich um 450nm (Parker et al., 1978). Neben zwei Absorptionsmaxima im kurzwelligen UV-Bereich bilden viele Pteridine wie Pteridin (370-385nm), Biopterin (342-348nm), Xanthopterin (385-392nm), Isoxanthopterin (339-340nm) und Leukopterin (340nm) jeweils ein Absorptionsmaximum im langwelligen UV bzw. violetten Spektralbereich aus (Morton, 1975b). Das Anregungsmaximum von Xanthopterin (10mM in 0.1n NaOH, pH 11,8) liegt nach eigener Messung bei 396nm, das Emissionsmaximum bei 470nm. Alkalisches Umgebungsmilieu verursacht jeweils eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen. So verlagert sich beim Lumazin das Anregungsmaximum mit steigendem pH von 330nm nach 370nm (Tatischeff und Klein, 1984). Im Gegensatz zu den Pteridinen wird jedoch der im Blauen absorbierende Fluorophor der Fliegenrhabdomere und der Semperzellen von *Deilephila* (Abb.22 und 50) maximal in saurem Medium gebildet. Daher kommen auch die Pteridine kaum in Betracht.

Die Synthese des einzigen bei Dipteren vorkommenden Omnochroms Xanthommatin (Linzen, 1967) als auch der gelben Pteri-

dine ist bei der weißäugigen Mutante von *Calliphora* "Chalky" unterbrochen (Langer, 1975). Daher sind auch die Ommochrome als Kandidaten unwahrscheinlich. Trotz Fehlens des Xanthommatins ist nicht völlig auszuschließen, daß dessen farblose Vorstufen lichtaktivierbar sind, denn das Kynurenin als letzte noch gebildete Vorstufe hat ein Absorptionsmaximum um 360nm (Rauen, 1964).

Letztendlich sind als mögliche Kandidaten die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Octopamin zu nennen. Katecholamine ändern sowohl bei Belichtung als auch bei Wechsel des pH-Werts ihre spektralen Absorptionseigenschaften. Bei Belichtung geht Adrenalin in das um 500nm absorbierende Adrenochrom über. Im alkalischen Milieu absorbieren Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin nach eigener Messung im in Frage kommenden Spektralbereich (350 bis 380nm).

Membrangebundene Chinone kommen vielfach in Elektronentransportsystemen vor, so in Chloroplasten als Plastochinon und in Mitochondrien als Ubichinon. Ubichinone werden aber auch in anderen biologischen Membranen gefunden, wobei ein Teil in nicht proteingebundener Form vorliegen kann (Ondarroa und Quinn, 1986). Ubichinon hat neben seinem Absorptionsmaximum bei 272nm ein schwaches Maximum bei 407nm und zeigt immer Absorptionsmodulation im Bereich um 370nm (Morton, 1975b). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Anregungs- und Emissionsspektren der Phospholipidvesikel mit incorporiertem Ubichinon stimmen recht gut mit denen der untersuchten Organellen überein. Weiterhin zeigen die Vesikel bei UV- und Blaubelichtung fast identische Modulationen. Durch Injektion von Ubichinon in Fliegenaugen läßt sich die Fluoreszenz deutlich ver-

stärken (Abb.72). Von allen diskutierten Stoffen ist daher Ubichinon noch der wahrscheinlichste Kandidat: Modellexperimente haben gezeigt, daß maximal bis zu 25 mol% CoQ10 nicht-stoichiometrisch in Phospholipidvesikel eingebaut werden (Michaelis und Moore, 1985). Die Orientierung des Ubichinons in der Membran ist dabei umstritten. Während Ondarroa und Quinn (1986) davon ausgehen, daß alles Ubichinon im Membrankern zwischen den Lipidschichten eingelagert ist, vertreten Aranda und Gomez-Fernandez, (1985, 1986) die Auffassung, daß nur das Ubichinon im Membrankern eingelagert ist, wohingegen das Ubichinol die Membran durchspannt. Sidham et al. (1984) gehen davon aus, daß die Ubichinone stets durch die Membran hindurchreichen.

Die in den Abbildungen 67 bis 70 vorgestellten Daten über die Fluoreszenzeigenschaften der Ubichinon-Phospholipidvesikel stützen und erweitern die Hypothese eines membrandurchgreifenden Einbaus der Ubichinone in die Phospholipiddoppelschicht. Aufgrund der pH-Sensitivität dieses Fluorophorsystems lassen sich auch Aussagen über die Orientierung der Chinonkomponente des Ubichinons in der Vesikelmembran machen: Solange kein pH-Gradient über der Vesikelmembran besteht, sind die Emissionsdifferenzspektren sowohl im sauren wie im alkalischen Milieu ähnlich; größere Unterschiede sind nur nach der primären UV-Bestrahlung zu beobachten (diphasisches Differenzspektrum im Alkalischen, Abb.68, monophasisches im Sauren, Abb.70). Wird dagegen über der Vesikelmembran ein pH-Gradient aufgebaut, werden die spektralen Fluoreszenzeigenschaften sowohl durch dessen Höhe moduliert als auch von der Richtung des pH-Gefälles über der Membran bestimmt: Nach Abbildung 70 - obere und

mittlere Darstellung - bedingt UV-Belichtung bei sauren Vesikeln im alkalischen Milieu Zunahme der Fluoreszenz um 500nm, dagegen bei alkalischen Vesikeln in saurem Milieu Abnahme der Fluoreszenz um 460nm. Auch die Differenzspektren nach alternierender UV- und Blaubelichtung unterscheiden sich qualitativ. Dieser Befund weist darauf hin, daß bereits bei der Herstellung der Vesikel in saurem bzw. alkalischem Milieu die Ubichinone seitenspezifisch in die Vesikelmembran eingelagert werden und somit synchron auf den von außen angelegten pH reagieren können. Die hohe Reproduzierbarkeit der Differenzspektren nach alternierender Blau- und UV-Belichtung spricht weiterhin dafür, daß die Moleküle ihre primäre Orientierung beibehalten und kaum zur Gegenseite der Membran wechseln können. Inwieweit dies auch gilt, wenn kein pH-Gradient vorliegt, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden. Da sich die diphasischen Differenzspektren bei Fehlen eines pH-Gradienten (Abb.68 und Abb.70 untere Reihe) durch die monophasischen Differenzspektren bei gegenläufigem pH-Gradienten (Abb.70 obere und mittlere Reihe) synthetisieren lassen (Abb.71), ist es wahrscheinlich, daß bei Fehlen eines pH-Gradienten beide Molekülzustände in etwa gleicher Häufigkeit gemischt vorkommen. Aus den Fluoreszenzdaten läßt sich noch nicht entscheiden, nach welcher Seite der Vesikelmembran der Chinonring exponiert ist. Hierzu ergeben sich einige Hinweise aus der Geometrie und der molekularen Komposition der Vesikel. Nach längerem Beschallen beträgt der Durchmesser der Vesikel aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen 500 bis 700 Å (Michaelis und Moore, 1985). Der untere Grenzwert von 500 Å entspricht in etwa dem Durchmesser eines Mikrovillus. Der innere Radius eines solchen Vesikels beträgt etwa 180 Å, der des äußeren 250 Å. Die

Oberfläche der durch den äußeren Monolayer begrenzten Kugel beträgt ca.  $8 \times 10^5 \text{ \AA}^2$ , die Oberfläche des inneren Monolayers ca.  $4 \times 10^5 \text{ \AA}^2$ . Wenn man davon ausgeht, daß jedes Phospholipid eine Fläche von  $65 \text{ \AA}^2$  belegt, so entfallen auf die äußere Kugelschale eines nur aus Phospholipiden bestehenden Vesikels  $12 \times 10^3$  Phospholipide und auf die innere Kugelschale  $6 \times 10^3$  Phospholipide. Es besteht also ein Verhältnis von 2:1. Nimmt man an, daß die molekulare Ratio von Ubichinon zu Phospholipid (1:3, Michaelis und Moore, 1985) konstant ist, muß zwangsläufig die Innenseite des Bilayers nur halb so viel Ubichinone enthalten wie die Außenseite (s. Abb.75). Hieraus folgt, daß bei symmetrischer Verteilung jedes Ubichinon statistisch nur von drei Phospholipiden umgeben ist. Bei membrandurchgreifender Anordnung der Trienkette ergibt sich zwangsläufig eine parakristalline Struktur der Vesikelmembran, bedingt durch jeweils drei ineinander verzahnte Trienketten (Zwei von der Außenseite gegen Eine von der Innenseite). Bereits diese Membrangeometrie könnte für die vom Ionengradienten abhängigen Fluoreszenzeigenschaften verantwortlich sein. Eine Interaktion gleichgerichteter Ubichinone erscheint ebenfalls möglich. Hier sei nur der Extremfall eines völlig asymmetrischen Membranaufbaus genannt, wobei die äußere Membran ausschließlich von Phospholipiden und die innere Membran von Phospholipiden und Ubichinon im Verhältnis 1:1 gebildet wird. Auch in diesem Fall ist eine ähnlich enge Nachbarschaft und mögliche Wechselwirkung der membrandurchgreifenden Trienkette gegeben. Für eine enge Wechselwirkung zwischen benachbarten Ubichinonmolekülen und/oder Phospholipiden spricht weiterhin die hohe Fluoreszenzintensität, die nur erklärbar ist, wenn die spektralen Absorptionseigenschaften des parakristallinen Membrankomplexes



Abb.75

Legende s. Seite 129

wesentlich höher als die der gelösten Membranbausteine sind.

In der natürlichen Mikrovillusmembran, die sich durch einen hohen Cholesterolgehalt (Ein Cholesterol zu drei Phospholipiden bei *Deilephila*, Zinkler, 1975; Tintenfischrhabdomer 1:2, Paulsen et al., 1983) auszeichnet, ist ebenfalls ein parakristallines Membranismuster wahrscheinlich, in das das Ubichinon integriert sein könnte.

Seta et al. (1985) zeigten, daß membrandurchspannend angeordnete Carotenoid-Porphyrin-Chinon-Triaden bei Anwesenheit von Elektronendonoren und -akzeptoren einen konstanten Photostrom über einen Phospholipidbilayer transportieren. Es ist vorstellbar, daß durch die enge parakristalline Struktur der Trienkette auch diese elektronenleitende Eigenschaften gewinnt.

#### Abb75.

Modell der Ubichinonanordnung in Phospholipidvesikeln bzw. in der Mikrovillusmembran. Bauelemente der Membran: PE = Phosphatidyläthanolamin; PC = Phosphatidylcholin; Ch = Cholesterol; Q10 = Ubichinon. Bei einem Flächenverhältnis von Innen- zu Außenseite von 1:2 und konstantem molekularem Verhältnis von Q10 zu Phospholipid von 1:3 ist zwangsläufig eine Asymmetrie von zwei Chinonen außenseitig zu einem Chinon innenseitig zu erwarten. Durch Assoziation von zwei oder drei Chinonen könnte eine transmembrane elektronenleitende Struktur entstehen, wie in der Mitte der Darstellung angedeutet. Bei der Mikrovillusmembran wird die Membrankrümmung vermutlich durch den asymmetrischen Einbau von Cholesterol in die äußere Lipidschicht und einem molaren Verhältnis Cholesterol zu Phospholipid von 1:1 ermöglicht.

#### 4.4. Abschätzung der molekularen Dichte der Fluorophore

Die extrem hohe Intensität der Fluoreszenz der Fliegenhabdome spricht für eine hohe Konzentration der Fluorophore in den Mikrovilli. Hieraus könnte folgen, daß das Fluorophorsystem am Transduktionsprozeß beteiligt ist. Falls dies zutrifft, sollte die Konzentration der Fluorophormoleküle ähnlich der der Rhodopsinmoleküle in der Mikrovillusmembran sein. Das Verhältnis Fluorophor zu Rhodopsin kann mit Hilfe des in Material und Methode 2.10. beschriebenen Verfahrens abgeschätzt werden. Die geringst mögliche Konzentration in den Mikrovilli ergibt sich, wenn man von den extremen Annahmen ausgeht, daß die molekulare Absorption extrem hoch - ähnlich hoch wie die des R495 (40000) - ist, und daß die Quantenausbeute für die Fluoreszenz ebenfalls extrem hoch nahe Eins ist. Bei dem in Abbildung 16 ( $\lambda_e = 400\text{nm}$ ) gezeigten Emissionsspektrum der Fliegenrhabdomere wurde eine Kreisfläche von  $300\ \mu\text{m}^2$  beleuchtet. Die Anzahl der eingestrahlteten Quanten ergibt sich nach Tabelle 1 für das Objektiv 40x zu  $4.5 \times 10^9$  Quanten/s. Die Anzahl der emittierten Quanten ( $5 \times 10^6$  Quanten/s) folgt aus dem Quotienten des Integrals des Emissionsspektrums ( $3 \times 10^4$  Quanten/s) und des Korrekturfaktors  $g_{\text{maz}}$  ( $6 \times 10^{-3}$ ). Das Verhältnis von emittierten / eingestrahlteten Quanten beträgt  $1.1 \times 10^{-3} / 1$ . Für einen hypothetischen Fluorophor der molaren Absorption von 40000 und einer Quantenausbeute von Eins folgt hieraus eine molare Konzentration von 0.07mM. Diese Konzentration liegt bereits in der gleichen Größenordnung wie die molare Konzentration des Rhodopsins in den Rhabdomeren. Bereits bei dieser niedrigsten Abschätzung ergibt sich ein molares Verhältnis von Rhodopsin zu Fluorophor von 4:1. Falls die Quantenausbeute

kleiner als Eins und/oder der Absorptionskoeffizient kleiner als 40000 ist, berechnen sich wesentlich höhere Konzentrationen. Die Absorptionskoeffizienten der diskutierten Farbstoffe sind erheblich kleiner als die des Rhodopsins (z.B. Lactoflavin bei 450nm: 12000; NADH bei 340nm: 6000; Ubichinon bei 320nm: 1500) und ihre Quantenausbeute wesentlich kleiner als Eins. Daher dürfte die molare Konzentration der Fluorophore mindestens gleich der des Rhodopsins sein oder letztere sogar noch übersteigen. Ein molares Verhältnis  $\leq 1$  spricht für eine physiologische Relevanz im Phototransduktionsmechanismus.

#### 4.5. Mögliche physiologische Bedeutung der Fluorophorsysteme

---

Die inverse Beziehung zwischen Fluoreszenzanstieg nach UV-Adaptation und Rhodopsingehalt im Fliegenrhabdomer (Tabelle 3) macht es - wie schon diskutiert - wahrscheinlich, daß das Fluorophorsystem direkt an die Mikrovilli und nicht an anhaftende Membrankompartimente gekoppelt ist. Ist dies der Fall, kann die inverse Beziehung auf zweierlei Weise interpretiert werden: 1., daß mit sinkendem Rhodopsingehalt (aufgrund Vitamin-A-arter Diät) die Zahl der Fluorophormoleküle entsprechend anwächst, d.h., daß diese ersatzweise in die Mikrovillusemembran eingebaut werden, oder 2., daß die Konzentration der Fluorophore unabhängig vom Rhodopsingehalt etwa konstant gehalten wird, deren Fluoreszenz aber bei Anwesenheit von Rhodopsin durch dieses gelöscht wird. Dies wäre dann eine Energieübertragung analog dem Energietransfer bei "sensitizing pigments". Falls eine derartige Fluoreszenzlöschung existiert, muß der Abstand des Fluorophordipols zum 11-cis-3-hydroxy-Retinal 20 bis 30 Å betragen (Kirschfeld, 1986). In den Rhabdomeren der reaktionsschnellen Fliegenrezeptoren ist

die Konzentration der Fluorophore besonders hoch. Es ist daher gut möglich, daß bei diesem schnellen Rezeptortyp das Fluorophorsystem als Redoxsystem besondere Bedeutung besitzt und möglicherweise sogar in die hier besonders schnell und präzis arbeitende biochemische Reaktionskaskade der Transduktions- und Adaptationsprozesse direkt involviert ist.

Aus der weiten Verbreitung derartiger Fluorophore, so in Rhabdomeren, Semperzellen und - in etwas abgewandelter Form - auch in der Cornea lassen sich eine Reihe weiterer möglicher physiologischer Bedeutungen ableiten, so z.B. für die Auslösung der Schirmpigmentwanderung: Bei den Sphingidae wird die Schirmpigmentwanderung sehr wahrscheinlich nicht von den Sehfärbstoffen der Photorezeptoren gesteuert (Hamdorf et al., 1986; Land, 1987), sondern durch ein besonders im ultravioletten und violetten Spektralbereich empfindliches Farbstoffprinzip, das entweder in den sekundären Schirmpigmentzellen oder in direkt benachbarten Zellstrukturen lokalisiert sein muß (Hamdorf und Höglund, 1981). Die in Semperzellen und der Cornea vorkommenden Fluorophore könnten Teil eines derartigen Farbstoffprinzips sein. Hierbei könnten die Fluorophore als Antennen wirken, und z.B. einen Neurotransmitterspiegel (Katecholamine), der den Kontraktionszustand des Schirmpigments steuert kontrollieren (Juse et al., 1987). Das Vorhandensein von Fluorophoren in den Semperzellen von *Ascalaphus*, einem Insekt das nur bei hellem Sonnenschein aktiv ist und überwiegend UV-Photorezeptoren besitzt (Gogala, 1967), unterstützt ebenfalls diese Hypothese.

Die experimentell verwendeten Lichtintensitäten bei der Blau- und UV-Adaptation waren wesentlich höher als sie unter natürlichen Bedingungen vorkommen. Dennoch werden sich auch unter natürlichen Bestrahlungsbedingungen bei dominanter UV- oder Blaustrahlung des Himmelslichtes photochemische Gleichgewichte einstellen. Inwieweit unter natürlichen Bestrahlungsbedingungen die Fluoreszenz in den Rhabdomeren, Semperzellen und der Cornea eine physiologisch relevante Höhe erreicht ist zur Zeit nicht zu entscheiden. Denkbar wäre hier eine zweite "sensitizing"-Funktion, bei der UV-Licht über die Fluoreszenz in sichtbares Licht umgewandelt und auf im Blauen absorbierenden Sehfarbstoffe übertragen wird.

## 5. Zusammenfassung

1. Mit Hilfe eines computergesteuerten fluoreszenzmikroskopischen Meßsystems, welches die Analyse von Anregungs- und Emissionsspektren erlaubt, wurden die verschiedenen zellulären Bauelemente von Komplexaugen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Als Versuchsobjekte wurden neurale Superpositionsaugen der Schmeißfliege und die Superpositionsaugen des mittleren Weinschwärmers und des Netzflüglers *Ascalaphus* verwendet.
2. Besonders auffällige Autofluoreszenz zeigten folgende Bauelemente: Rhabdomere, Semperzellen, Cornea und Tracheolen. Während die Fluoreszenz der Tracheolen stabil erscheint, lassen sich die Fluoreszenzen der anderen Elemente durch UV- und Blauadaptation modulieren. Die Eigenschaften letzterer Fluorophore wurden eingehender studiert.
3. Die Rhabdomere der Fliegen- und Schwärmeraugen besitzen einen primären Fluorophor  $A_R$  ( $\lambda_{max} = 370nm$ ), der durch UV-Bestrahlung in einen sekundären Fluorophor  $B_R$  ( $\lambda_{max} = 440nm$ ) übergeht und durch Blaustrahlung vollständig in  $A_R$  photoregeneriert wird. Die Emissionsmaxima dieses photoreversiblen Systems liegen bei 460nm und 550nm. Sowohl bei der Vorwärts- als auch bei der Rückwärtsreaktion treten Photozwischenprodukte auf, die thermisch in  $B_R$  bzw.  $A_R$  übergehen. Bei Bestrahlung im Überlappungsbereich der Absorptionsspektren stellen sich photochemische Gleichgewichte zwischen  $A_R$  und  $B_R$  ein. Beide Photoreaktionen sind Einquanteneffekte. Die durch UV induzierte Fluoreszenzmodulation ist stark pH-abhängig. Die Steilheit der Funktion mit einem Hillkoeffizienten von 2 bei einem pK von 6.3 spricht für die Aufnahme zweier Protonen bei der Vorwärtsreaktion. Die Amplitude der UV-induzierten Fluoreszenz

wächst stark mit sinkendem Sehfärbstoffgehalt; ein starkes Indiz dafür, daß die Fluorophore keine Retinoidfarbstoffe sind.

4. Die Semperzellen der Fliege und des Netzflüglers besitzen ein Fluorophorsystem sehr ähnlicher Eigenschaften, wie das der Rhabdomere (wie unter 3. beschrieben).

Die Fluorophore der Semperzellen von *Deilephila* unterscheiden sich von den oben genannten wie folgt: Der primäre Fluorophor  $A_{DS}$  ( $\lambda_{max}$  um 380nm) geht durch UV-Strahlung in einen Fluorophor  $B_{DS}$  mit sehr ähnlichen Absorptions- jedoch wesentlich höheren Emissionseigenschaften wie  $A_{DS}$  über. Das Photoprodukt  $B_{DS}$  hat offensichtlich eine niedrigere Absorptionsbande bei 470nm. Bei Blaubestrahlung verschwindet diese Bande, dafür erhöht sich die Absorption um 400nm. Letztere Modulation ist photo-reversibel, zeigt also die Existenz eines dritten Fluorophors  $C_{DS}$  ( $\lambda_{max} = 400nm$ ). Der Photoübergang von  $A_{DS}$  nach  $B_{DS}$  ist stark pH-abhängig. Der Hillkoeffizient von 1 spricht für die Aufnahme eines Protons bei dieser Reaktion.

5. Die Corneae der Fliege und des Schwärmers enthalten vergleichbare UV-blau-sensitive Fluorophorsysteme geringer Photo-reversibilität. Diese Fluorophore sind (bei *Deilephila*) in die Lamellen eingelagert, die die Schichten unterschiedlicher Brechungsindizes voneinander trennen. In vivo Experimente bei orthodromer Anregung zeigten, daß die Bleichung der cornealen Fluoreszenz nach mehrstündiger Dunkelperiode regeneriert wird.

6. Vergleichbare Fluoreszenzeigenschaften, wie unter 3. und 4. beschrieben, ließen sich in Phospholipid-Ubichinonvesikeln modellartig nachbilden. Auch hier bedingen UV- und Blaubestrahlung Modulationen im Anregungs- und Emissionsspektrum. Diese Modulationen sind nicht nur pH-abhängig sondern auch von der Richtung des pH-Gradienten über der Vesikelmembran. Letzteres

spricht dafür, daß die Ubichinone asymmetrisch membrandurchgreifend angeordnet sind (Membranaußenseite/-innenseite = 2 CoQ10/1 CoQ10). Injektion von Ubichinon in Fliegenaugen mittleren Sehfarbstoffgehalts bedingt eine starke Erhöhung der UV-Blau-modulierbaren Fluoreszenz in den Rhabdomeren.

7. Aufgrund der unter 1. bis 6. genannten Fluoreszenzeigenschaften ist anzunehmen, daß die in den untersuchten Strukturen aufgefundenen Fluorophorsysteme der Stoffgruppe der Chinone angehören. Weiterhin ist aufgrund der abgeschätzten molekularen Dichte derartiger photosensitiver Redoxfarbstoffe in den Rhabdomeren zu erwarten, daß diese bei den Phototransduktionsprozessen der Rezeptorerregung eine nicht unbedeutende Rolle spielen.

6. Literaturverzeichnis

-----

Angiolillo, P.J., Leigh, J.S., Vanderkooi, J.M.: Resolved fluorescence emission spectra of iron-free cytochrome c. Photochem. Photobiol. 36, 133-137 (1982)

---

Aranda, F.J., Gomez-Fernandez, J.C.: The interaction of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 with phospholipid bilayers. A study using differential scanning calorimetry and turbidity measurements. Biochim. Biophys. Acta 820, 19-26 (1985)

---

Aranda, F.J., Gomez-Fernandez, J.C.: Fluorescence probe studies of the interaction of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 with phosphatidylcholine bilayers. Biochemistry International 12, 137-143 (1986)

---

Autrum, H., Tscharrntke H.: Der Sauerstoffverbrauch der Insektenretina im Licht und im Dunkeln. Z. vergl. Physiol. 45, 695-710 (1962)

---

Chance, B., Schoener, B.: Fluorometric studies of flavin component of the respiratory chain. In: Flavins and Flavoproteins (ed. E.C.Slater). Elsevier, Amsterdam, New York, 510-528 (1966)

Fraikin, G.Y., Pospelow, M.E., Ivanova, E.V.: Action spectrum for suppression of succinate oxidase activity in yeast mitochondria. Photochem. Photobiol. 11, 67-71 (1986)

---

Franceschini, N.: In vivo fluorescence of the rhabdomeres in an insect eye. Proc. Int. Union Physiol. Sci., 27th Int. Congr. Paris 13, 237 (1977)

---

Franceschini, N., Kirschfeld, K., Minke, B.: Fluorescence of photoreceptor cells observed in vivo. Science 213, 1264-1267 (1981)

Franceschini, N., Stavenga, D.: Ultra-violet sensitizing pigment of flies studied by in vivo microspectrofluorimetry. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. suppl. 20, 111 (1981)

Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.-M., Mayhew, S.G.: Fluorescence and optical characteristics of reduced Flavins and Flavoproteins. Biochemistry 13, 589-597 (1974)

Gogala, M.: Die spektrale Empfindlichkeit der Doppelaugen von *Ascalaphus macaronius* Scop. (Neuroptera, Ascalaphidae). Z. vergl. Physiol. 57, 232-243 (1967)

Guzzo, A.V., Pool, G.L.: Fluorescence spectra of the intermediates of rhodopsin bleaching. Photochem. Photobiol. 9, 565-570 (1969)

Hall, C.L., Kamin, H.: Fluorescence and absorbance properties of electron transfer flavoprotein from pig liver mitochondria. In: *Flavins and Flavoproteins* (ed. T.P.Singer). Elsevier, Amsterdam, New York, 679-687 (1976)

Hall, C.L., Kamin, H.: The purification and some properties of electron transfer flavoprotein and general fatty acyl coenzyme A dehydrogenase from pig liver mitochondria. J.Biol. Chem. 250, 3476-3486 (1975)

Hamdorf, K.: The physiology of invertebrate visual pigments. In: *Handbook of sensory physiology*, Vol VII/6A (ed. H.Autrum). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 145-224 (1979)

Hamdorf, K., Paulsen, R., Schwemer, J.: Photoregeneration and sensitivity control of photoreceptors of invertebrates. In Biochemistry and physiology of visual pigments (ed. H.Langer). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 155-166 (1973)

Hamdorf, K., Schwemer, J.: Photoregeneration and the adaptation process in insect photoreceptors. In: Photoreceptor optics (eds. A.W.Snyder, R.Menzel). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 263-289 (1975)

Hamdorf, K., Kaschef, A.H.: Der Sauerstoffverbrauch des Facettenauges von *Calliphora erythrocephala* in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Ionenmilieu. *Z. vergl. Physiol.* 48, 251-265 (1964) ---

Hamdorf, K., Höglund, G.: Light induced retinal screening pigment migration independent of visual cell activity. *J. Comp. Physiol.* 143, 305-309 (1981) ---

Hamdorf, K., Höglund, G., Juse, A.: Ultra-violet and blue induced migration of screening pigment in the retina of the moth *Deilephila elpenor*. *J. Comp. Physiol.* 159, 353-362 (1986) ---

Hamdorf, K., Hochstrate, P., Höglund, G., Burbach, B., Wiegand, U.: Light activation of the sodium pump in blowfly photoreceptors. *J. Comp. Physiol.* (1987) In press.

Juse, A., Höglund, G., Hamdorf, K.: Reversed light reaction of the screening pigment in a compound eye induced by nor-adrenaline. *Z. f. Natforsch.* (1987) In press.

Kirschfeld, K.: Activation of visual pigment: Chromophore structure and function. In: The molecular mechanism of photoreception. (ed. H.Stieve). Dahlem Konferenzen. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 31-49 (1986)

Kirschfeld, K., Vogt, K.: Does Retinol serve a sensitizing function in insect photoreceptors? Vision Res. 26, 1771-1777 (1986)

Kunz, W.S.: Spectral properties of fluorescent flavoproteins of isolated rat liver mitochondria. FEBS Lett. 195, 92-9 (1986)

Land, M.F.: Screening pigment migration in a sphingid moth is triggered by light near the cornea. J. Comp. Physiol. 160, 355-357 (1987)

Langer, H.: Properties and functions of screening pigments in insect eyes. In: Photoreceptor Optics (eds. A.W.Snyder, R. Menzel). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 429-455 (1975)

Liebman, P.A., Leigh, R.A.: Autofluorescence of visual receptors. Nature (Lond.) 221, 1249-1251 (1969)

Linzen, B.: Zur Biochemie der Ommochrome. Unterteilung, Vorkommen, Biosynthese und physiologische Zusammenhänge. Naturwiss. 54, 259-267 (1967)

Melhuish, W.H.: Measurement of quantum efficiencies of fluorescence and phosphorescence and some suggested luminescence standards. J. Opt. Soc. Amer. 54, 183-186 (1964)

Michaelis, L., Moore, M.J.: Location of ubiquinone-10 (CoQ-10) in phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 82, 121-129 (1985)  
---

Miller, G.V., Itoku, K.A., Fleischer, A.B., Stark, W.S.: Studies of fluorescence in *Drosophila* compound eyes: changes induced by intense light and vitamin A deprivation. *J. Comp. Physiol.* 154, 297-305 (1984)  
---

Minke, B., Kirschfeld, K.: The contribution of a sensitizing pigment to the photosensitivity spectra of fly rhodopsin and metarhodopsin. *J. Gen. Physiol.* 73, 517-540 (1979)  
---

Morton, R.A.: *Biochemical Spectroscopy Vol.1.* Adam Hilger, Bristol (1975)

Morton, R.A.: *Biochemical Spectroscopy Vol.2.* Adam Hilger, Bristol (1975)

Ondarroa, M., Quinn, P.J.: A difference infrared-spectroscopic study of the interaction of ubiquinone-10 with phospholipid bilayers. *Biochem. J.* 240, 325-331 (1986)  
---

Parker, R.T., Freeland, R.S., Schulman, E.M., Dunlab, R.B.: Room temperature phosphorescence of selected pteridines. In: *Chemistry and Biology of Pteridines* (eds. R.L.Krisliuk, G.M. Brown). Elsevier New York, Amsterdam, Oxford, 61-62 (1978)

Paulsen, R., Zinkler, D., Delmelle, M.: Architecture and dynamics of microvillar photoreceptor membranes of a cephalopod. *Exp. Eye. Res.* 36, 47-56 (1983)  
---

Piantidosi, C.A., Jöbsis-Vandervliet, F.F.: Spectrophotometry of cerebral cytochrome a, a in bloodless rats. Brain Res. 305, 89-94 (1984)  
---

Rauen, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, Teil I. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 866 (1964)

Schlecht, P., Juse, A., Höglund, G., Hamdorf, K.: Photoreconvertible fluorophore systems in photoreceptors, semper-cells, and corneal lenses in the compound eye of the blowfly. J. Comp. Physiol. (1987) In press.

Scholz, R., Thurman, R.G., Williamson, J.R., Chance, B., Bücher, T.: Flavin and pyridine nucleotide oxidation-reduction changes in perfused rat liver. I. Anoxia and subcellular localization of fluorescent flavoproteins. J. Biol. Chem. 244, 2317-2324 (1969)  
---

Schwemer, J.: Molekulare Grundlagen der Photorezeption bei der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* Meig. Habilitationsschrift, Ruhr-Universität Bochum, 1-153 (1979)

Schwemer, J.: Turnover of photoreceptor membrane and visual pigment in invertebrates. In: The molecular mechanism of photoreception. (ed. H.Stieve). Dahlem Konferenzen. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 303-326 (1986)

Schwemer, J.: Pathways of visual pigment regeneration in fly photoreceptor cells. Biophys. Struct. Mech. 9, 287-298 (1983)  
-

Seta, P., Bienvenue, E., Moore, A.L., Mathis, P., Bensasson, R.V., Liddell, P., Pessiki, P.J., Joy, A., Moore, T.A., Gust, D.: Photodriven transmembrane charge separation and electron transfer by a carotenoporphyry-quinone triad. *Nature (Lond.)* 316, 653-655 (1985)  
---

Sidham, M.A., McIntosh, T.J., Siedow, J.N.: On the localization of ubiquinone in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 767, 423-431 (1984)  
---

Stark, W.S., Ivanyshyn, A.M., Greenberg, R.M.: Sensitivity and photopigments of R1-6, a two-peaked photoreceptor, in *Drosophila*, *Calliphora* and *Musca*. *J. Comp. Physiol.* 121, 289-305 (1977)  
-----

Stark, W.S., Stavenga, D.G., Kruizinga B.: Fly photoreceptor fluorescence fluorescence is related to UV sensitivity. *Nature (Lond.)* 280, 581-583 (1979)  
---

Stark, W.S., Tan, K.E.W.P.: Ultraviolet light: Photosensitivity and other effects on the visual system. *Photochem. Photobiol.* 36, 371-380 (1982)  
--

Stavenga, D.G., Tinbergen, J.: Light dependence of oxidative metabolism in fly compound eyes studied *in vivo* by microspectrofluorometry. *Naturwiss.* 70, 618-620 (1983)  
---

Stavenga, D.G., Francheschini, N., Kirschfeld, K.: Fluorescence of housefly visual pigment. *Photochem. Photobiol.* 40, 653-659 (1984)  
--

Tatischeff, I., Klein, R.: Extracellular lumazine from aggregating *Dictyostelium discoideum* cells. Influence of pH on its fluorescence. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1255-1262 (1984)

Tinbergen, J., Stavenga, D.G.: Photoreceptor redox state monitored in vivo by transmission and fluorescence microspectrophotometry in blowfly compound eyes. Vis. Research 26, 239-243 (1986)

Tinbergen, J., Stavenga, D.G.: Spectral sensitivity of light induced respiratory activity of photoreceptor mitochondria in the intact fly. J. Comp. Physiol. 160, 195-203 (1987)

Tsacopoulos, M., Poitry, S.: Kinetics of oxygen consumption after a single flash of light in photoreceptors of the drone (*Apis mellifera*). J. Gen. Physiol. 80, 19-56 (1982)

Vogt, K., Kirschfeld, K.: Sensitizing pigment in the fly. Biophys. Struct. Mech. 9, 319-328 (1983)

Vogt, K., Kirschfeld, K.: Chemical identity of the chromophores of fly visual pigment. Naturwiss. 71, 211-213 (1984)

Walz, B.: Association between cytoskeletal microtubules and Ca<sup>2+</sup>-sequestering smooth ER in semper cells of fly ommatidia. European J. Cell Biol. 32, 92-98 (1983)

White, C.E., Argauer, R.: Fluorescence analysis, a practical approach. Dekker, New York. (1970)

Zinkler, D.: Zum Lipidmuster der Photorezeptoren von Insekten. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 67, 28-32 (1975)

Zinkler, D.: Der Einfluß von Mangeldiäten auf den Lipid- und  
Rhodopsingehalt des Auges der Schmeißfliege *Calliphora ery-*  
*throcephala*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 75, 232 (1982)  
-----



Danksagung :

-----  
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Hamdorf für die Bereitstellung des Themas, seine ausgezeichnete Betreuung und nimmermüde Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich außerdem bedanken bei:

Herrn Dr. P. Schlecht für seine intensive Hilfe bei der Ausarbeitung der theoretischen Zusammenhänge und für die Erstellung der Computerprogramme.

Herrn Dr. P. Hochstrate für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Petra Jergolla für die technische Assistenz bei der Erstellung der Zeichnungen.

Frau Ilse Paas für die großartigen Photos.

Bei allen Codoktoranden der Arbeitsgruppe Sehphysiologie für ihre Diskussionen.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Sonderforschungsbereichs 114 "Bionach" unterstützt.



## Lebenslauf

- 12.04.1955 geboren in Langenberg/Rhld.; Eltern Gerd und Margot Juse, geb. Becker.
- 1962 - 1966 Besuch der Volksschule in Langenberg
- 1966 - 1974 Städt. Gymnasium, Langenberg; ab 1970 am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig.
- 1974 Reifeprüfung
- 1975 - 1976 Grundwehrdienst
- 1976 - 1982 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität, Bochum
- 1982 Diplomprüfung in Biologie; Diplomarbeit über das Thema "Die Eigenschaften der cornealen Fluoreszenz des Fliegenauges"
- 1983 - 1986 Durchführung der experimentellen Arbeiten an der Dissertation am Lehrstuhl für Tierphysiologie der Ruhr-Universität Bochum unter Anleitung von Prof. Dr. K. Hamdorf.  
Zugleich wissenschaftliche Hilfskraft.













